

**Die Rolle Natürlicher Killerzellen**  
**in der Autoimmunität**  
**am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis**

**Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Barbara Simm**

**München, 01.Juli 2008**







**Die Rolle Natürlicher Killerzellen**  
**in der Autoimmunität**  
**am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis**

**Dissertation**  
**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften**  
**an der Fakultät für Biologie**  
**der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Angefertigt am**  
**Institut für Molekulare Immunologie**  
**Helmholtz Zentrum München**  
**unter der Leitung von Frau Prof. Dr. D. J. Schendel**

**unter der Betreuung von PD Dr. C. S. Falk**  
**NCT- Nationales Centrum für Tumorerkrankungen**  
**am DKFZ und Institut für Immunologie**  
**Heidelberg**

**vorgelegt von**  
**Barbara Simm**  
**München, 01.Juli 2008**



**Erstgutachterin:**

**Frau PD Dr. Christine S. Falk**

**Zweitgutachterin:**

**Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß**

Dissertation eingereicht am:

01. Juli 2008

Tag der mündlichen Prüfung:

06. November 2008





# Inhalt

<b>Inhalt .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>III</b>
<b>A Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>B Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1 Natürliche Killerzellen .....	5
1.1 NK-Rezeptoren .....	8
1.2 NK-Zell-Subpopulationen.....	13
2 NK-Zellen und Autoimmunität.....	17
3 Autoimmune und nicht-autoimmune Gelenkerkrankungen.....	20
3.1 Arthrose .....	20
3.2 Rheumatoide Arthritis .....	21
3.3 Entzündungsreaktion im Kniegelenk bei Rheumatoider Arthritis .....	22
4 Psoriasis vulgaris.....	24
5 Aufgabenstellung.....	25
<b>C Material .....</b>	<b>26</b>
1 Geräte .....	26
2 Chemikalien.....	27
3 Verbrauchsmaterial Molekularbiologie .....	27
4 Verbrauchsmaterial Zellkultur .....	29
5 Verbrauchsmaterial Allgemein .....	31
6 Zelllinien .....	31
7 Blut- und Synovialflüssigkeitsproben .....	32
7.1 Arthritis-Patienten .....	32
7.2 Arthrose-Patienten.....	33
7.3 Psoriasis-Patienten.....	33
7.4 Normalspender .....	33
8 Antikörper .....	34
8.1 Primärantikörper .....	34
8.2 Sekundärantikörper .....	35
9 Multiplex Analysen mittels Luminex-Technologie.....	35
10 Kooperationspartner .....	36
11 Firmenverzeichnis .....	36
<b>D Methoden .....</b>	<b>37</b>
1 Methoden der Molekularbiologie.....	37
1.1 RNS-Isolierung.....	37
1.2 Reverse Transkription.....	37
1.3 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion).....	38
1.4 Gelelektrophorese .....	38
1.5 Isolierung von DNS aus Agarosegel.....	39
1.6 Klonierung von ULBP4syn in den pAcGFP1-N1-Vektor.....	39
1.7 Expression in Bakterien .....	41
1.8 Plasmid-Aufreinigung aus Bakterien .....	41
2 Methoden der Zellkultur .....	42
2.1 Isolierung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC) .....	42
2.2 Isolierung der mononukleären Zellen aus Synovialflüssigkeit (SFMC) .....	43
2.3 Bestimmung der Zellzahl .....	43
2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	44
2.5 Kultivierung von Zellen .....	44
2.6 Herstellung von ULBP4 Transfektanten mittels Elektroporation .....	45
3 Chromfreisetzungstest.....	46

4	Durchflusszytometrie .....	47
4.1	Allgemein .....	47
4.2	Direkte Färbung .....	48
4.3	Indirekte Färbung .....	48
4.4	Messung und Auswertung der Daten .....	48
5	CD107a-Degranulations-Versuch .....	50
6	CFSE-Proliferations-Versuch .....	51
7	Multiplex Analysen .....	52
7.1	Allgemein .....	52
7.2	HLA- und KIR-Typisierung mittels Luminex Software .....	53
7.3	Zytokinmessung mittels Bioplex Software .....	55
8	Herstellung monoklonaler ULBP4-spezifischer Antikörper .....	56
9	Statistik .....	57
<b>E</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
1	NK-Zellen im Kontext autoimmuner und nicht-autoimmuner Gelenkerkrankungen .....	58
1.1	Der Einfluss der Autoimmunität auf das NK-Zellinfiltrat .....	59
1.2	Anreicherung der CD56 <sup>bright</sup> NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit .....	60
1.3	Veränderung der Killer-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptor-Expression auf synovialen NK-Zellen .....	64
1.4	Korrelation der Infiltration mit CD6 .....	70
2	Zytotoxische Funktion der synovialen NK-Zellen .....	76
2.1	Die zytotoxische Eigenschaft der NK-Zellen .....	77
2.2	Vergleich der NKG2D-vermittelten Aktivierung zwischen synovialen und peripheren NK-Zellen .....	82
3	Definition autoimmuner und nicht-autoimmuner Zytokin- / Chemokinmuster .....	86
3.1	Chemokine und Rekrutierung von CD56 <sup>bright</sup> NK-Zellen .....	86
3.2	IL-17 als Leitzytokin der T <sub>H</sub> 17-Antwort in der autoimmunen Rheumatoiden Arthritis ...	88
3.3	Wachstumsfaktoren für Knorpel- und Knochenkomponenten in der Synovialflüssigkeit .....	93
3.4	Zytokinmuster in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zum Serum der Arthritis- und Arthrose-Patienten .....	94
4	NK-Zellen im Kontext der Psoriasis vulgaris .....	100
4.1	Verringerte Frequenz peripherer CD56 <sup>dim</sup> CD6 <sup>+</sup> NK-Zellen bei Psoriasis vulgaris .....	100
4.2	KIR <sup>+</sup> T-Zellen bei Psoriasis vulgaris .....	102
5	Genetische Assoziationen des HLA-C- und KIR-Lokus mit Autoimmunkrankheiten .....	104
5.1	HLA- und KIR-Assoziation bei Psoriasis vulgaris .....	104
5.2	HLA- und KIR-Assoziation bei Rheumatoider Arthritis .....	108
<b>F</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>112</b>
1	Die Dominanz der CD56 <sup>bright</sup> CD6 <sup>-</sup> NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten .....	112
2	Autoimmune und nicht-autoimmune Zytokinmuster .....	120
3	Frequenz der NK-Zellen bei Autoimmunkrankheiten .....	130
4	KIR- und HLA-C-Assoziationen bei Rheumatoider Arthritis und Psoriasis vulgaris .....	131
<b>G</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>133</b>
<b>H</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>146</b>
<b>I</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>148</b>
<b>J</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>162</b>

# Abkürzungen

Tab. 1	Verwendete Abkürzungen
Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität ( <i>antibody-dependent cellular</i> )
APC	Allophycocyanin
AR	aktivierender Rezeptor
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	ungefähr
CD	Differenzierungsantigen ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNS	zur mRNA komplementäre ( <i>complementary</i> ) DNS
CML	Chromfreisetzungstest ( <i>cell mediated lympholysis</i> )
<sup>51</sup> Cr	radioaktives Chromisotop
CTL	zytotoxische T-Zelle ( <i>cytotoxic T lymphocyte</i> )
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxy-Nukleotid-tri-Phosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Di-Natriummethylenediamintetraacetat
E:T	Effektor-zu-Zielzell-Ratio ( <i>effector cell to target cell ratio</i> )
FACS	fluoreszenzaktiviertes Zellsortiergerät (Durchflußzytometer)
FBS	fötales Rinderserum
FSC	Vorwärts-Streulicht ( <i>forward scatter</i> )
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
HLA	humane Leukozytenantigene
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IR	Inhibierender Rezeptor
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes aktivierendes Motiv ( <i>immunoreceptor</i> )
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes inhibierendes Motiv ( <i>immunoreceptor</i> )
kb	Kilobasenpaare
kD	kiloDalton
KIR	Killerzell Immunglobulin-Rezeptor ( <i>killer cell immunglobulin receptor</i> )
LRC	Leukozyten-Rezeptor-Komplex ( <i>leucoyte receptor complex</i> )
mAk	monoklonale Antikörper
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
mRNS	Boten-RNS ( <i>messenger-RNS</i> )
NCR	Natürliche-Zytotoxizitätsrezeptor ( <i>natural cytotoxicity receptor</i> )
NK	Natürliche Killerzelle
OA	Oligoarthritis
PA	Polyarthritis
PBL	Lymphozyten des peripheren Blutes
PBMC	Periphere Blut-mononukleäre Zellen
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHA	Phytohämagglutinin (Lektin)
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
RA	Rheumatoide Arthritis
ReA	Reaktive Arthritis
RPMI	Medium ( <i>Rosewell Park Memorial Institut</i> )
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
SF	Synovialflüssigkeit
SFMC	Synovialflüssigkeit-mononukleäre Zellen

SM	Selektionsmedium
SSC	Seitwärts-Streulicht ( <i>side scatter</i> )
Strep	Streptavidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TM	Tumormedium
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zellrezeptor
u.a.	unter anderem
U	Einheit der Enzymaktivität ( <i>unit</i> )
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
z. B.	zum Beispiel

## A Zusammenfassung

Das Immunsystem besteht aus Zellen der angeborenen und der erworbenen Immunität, die bei der Abwehr von Infektionen und Tumoren einer strengen Regulation unterliegen und miteinander interagieren. Bei Autoimmunerkrankungen gerät die Regulation dieser Prozesse außer Kontrolle, was dazu führt, dass das Immunsystem körpereigene Strukturen angreift. Bisher gibt es viele Untersuchungen zu autoreaktiven zytotoxischen T-Zellen oder Autoantikörper-produzierenden B-Zellen. NK-Zellen hingegen wurden im Kontext von Autoimmunerkrankheiten erst in neuerer Zeit untersucht. Besonders durch ihre Fähigkeit, in großen Mengen Zytokine zu produzieren, können NK-Zellen entscheidend an der Entstehung und Aufrechterhaltung von autoimmunen Prozessen beteiligt sein. NK-Zellen sind dazu in der Lage mit Dendritischen Zellen zu interagieren, und T-Zellen zu stimulieren. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Rolle der NK-Zellen im Kontext der Rheumatoiden Arthritis untersucht, einer Autoimmunerkrankheit, an deren Entstehung Zytokine maßgeblich beteiligt sind. Zum Vergleich wurden nicht-autoimmune Arthrose- und autoimmune Psoriasis-Patienten untersucht und ebenfalls mit Normalspendern verglichen. Da es schwierig ist, allein durch Untersuchungen der peripheren Immunzellen autoimmune Vorgänge zu erklären, wurden in dieser Arbeit Lymphozyten aus der Synovialflüssigkeit, dem Ort der Entzündung, isoliert und detailliert untersucht. Zunächst wurden die Zellen durch die durchflusszytometrischen Untersuchungen von >25 Markern phänotypisch charakterisiert. Des Weiteren wurde eine quantitative Analyse der Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren aus dem Serum und der Synovialflüssigkeit der Patienten durchgeführt, und bezüglich verschiedener „Leitzytokine“ und autoimmuner Muster ausgewertet. Da bei Autoimmunerkrankheiten genetische Assoziationen mit HLA- und KIR-Molekülen, den Hauptrezeptoren von NK-Zellen, beschrieben wurden, lag ein weiterer Aspekt auf den HLA-C- und KIR-Typisierungen, und ihrer Korrelation mit den verschiedenen Erkrankungen der Patienten.

Im peripheren Blut finden sich zwei NK-Zell-Subpopulationen, welche durch eine unterschiedliche Expressionsdichte der CD16- und CD56-Moleküle charakterisiert sind, und entsprechend als CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> bezeichnet werden. Im Blut besitzen 90 % der NK-Zellen den CD56<sup>dim</sup>-Phänotyp und 10 % den CD56<sup>bright</sup>-Phänotyp. In der Literatur wurde gezeigt, dass sich in der Synovialflüssigkeit, unabhängig von autoimmunen Prozessen, das Verhältnis der NK-Zell Subpopulationen verändert und die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen dominieren.

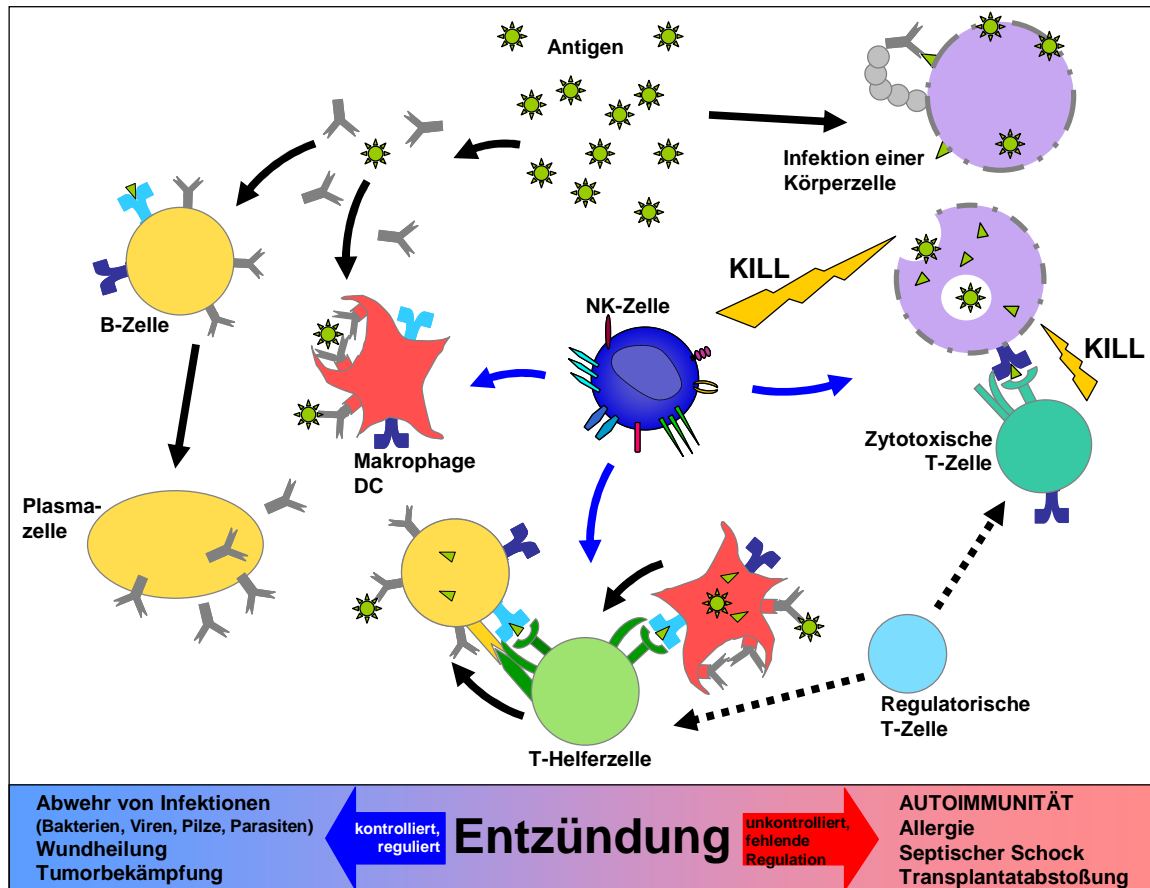
Die Expression von CD16 und CD56 konnte jedoch nicht zufriedenstellend mit der Gewebeeinfiltration korreliert werden, weshalb nach einem besseren differentiellen Marker gesucht wurde. In dieser Arbeit konnte erstmals das CD6-Molekül als dieser differentielle Infiltrationsmarker auf NK-Zellen identifiziert werden. Im Blut exprimieren die Mehrzahl der NK-Zellen und alle T-Zellen das CD6-Molekül. In der Synovialflüssigkeit liegen jedoch keine CD6-positiven NK-Zellen mehr vor, unabhängig davon ob sie CD56<sup>dim</sup> oder CD56<sup>bright</sup>, bzw. CD16<sup>+</sup> oder CD16<sup>-</sup> sind. Die Anzahl der CD6-positiven T-Zellen in der Synovialflüssigkeit ist dagegen unverändert, was auf eine spezielle Funktion von CD6 auf NK-Zellen hinweist. Interessanterweise konnte in der Peripherie der Patienten im Vergleich zu Normalspendern bereits eine verringerte Frequenz der CD6-positiven NK-Zellen detektiert werden, welche mit der Stärke der Entzündung korreliert und so künftig diagnostische Hinweise liefern könnte. Welche Mechanismen zum Ausschluss der CD6-positiven NK-Zellen führen, bedarf noch weiteren Untersuchungen, die durch Chemokine vermittelte Migration und Adhäsion scheint jedoch eine bedeutende Rolle zu spielen.

Bei der umfassenden Untersuchung der Zytokin- und Chemokin-Muster kristallisierte sich IL-17 als das „Leitzytokin“ bei Arthritis-Patienten heraus, da hier im Gegensatz zu den Arthrose-Patienten eine klar dominierende T<sub>H</sub>17/T<sub>H</sub>1-Immunantwort nachzuweisen war. Bestimmte Chemokine, wie CXCR3-Liganden, sind in der Synovialflüssigkeit an der gesteigerten Migration von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen beteiligt. Des Weiteren konnte ein klar autoimmunes von einem nicht-autoimmunen Zytokinmuster unterschieden werden, indem die Ratio der Zytokine und Chemokine aus Serum und Synovialflüssigkeit verglichen wurde. Diese Musterzuordnung konnte durch eine Software-Analyse der Rohdaten bestätigt werden und könnte in Zukunft somit ebenfalls eine diagnostische Möglichkeit in Bezug auf Autoimmunkrankheiten darstellen. Diese Ergebnisse ermöglichen einen umfassenden Eindruck von entzündlichen Geschehen bei Rheumatischen Erkrankungen und eröffnen neue Ansätze für therapeutische Interventionen.

## B Einleitung

Autoimmunerkrankungen entstehen durch eine unkontrollierte Reaktion des Immunsystems gegen körpereigene Bestandteile. Diese pathogenen Immunreaktionen haben ihren Ursprung meistens in einer komplizierten Kaskade verschiedener Mechanismen, die „normale“ Funktionen einer effektiven Immunantwort z.B. gegen Pathogene darstellen. Deshalb ist es wichtig, sich bei der Betrachtung autoimmuner Vorgänge immer das gesamte Immunsystem vor Augen zu halten, dessen komplexe Prozesse in die angeborene und die erworbene Immunantwort eingeteilt werden (Abb. 1). Die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sind neben den Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und Dendritischen Zellen Teil der angeborenen Immunität und stellen die erste Barriere des Immunsystems gegenüber Infektionserregern (Antigenen) dar. Die Zellen des angeborenen Systems verfügen entweder über unspezifische Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR), über die sie pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMPs) erkennen, oder werden über eine Vielzahl an Rezeptoren reguliert, wie es bei den NK-Zellen der Fall ist. Ist die Infektion durch die unspezifische Abwehr initial nicht sofort zu beheben, so produzieren die angeborenen Immunzellen Zytokine und Chemokine, setzen damit die Entzündungsreaktion in Gang und induzieren die adaptive Immunantwort, welche also zeitlich verzögert durch Antigen-spezifische T- und B-Lymphozyten vermittelt wird. Diese Zellen werden über ihren individuellen, klonal spezifischen Rezeptor reguliert. Wird ein B-Zellklon aktiviert, entsteht nach Affinitätsreifung, Immunglobulin-Klassenwechsel und Proliferation eine Plasmazelle, welche hohe Mengen an spezifischem Antikörper vom IgG-Isotyp produziert. Die Aktivierung von T-Helferzellen über deren spezifischen T-Zell-Rezeptor-(TZR)-Komplex führt zur Zytokinproduktion und zur weiteren Aktivierung des Immunsystems, vor allem der zytotoxischen T-Zellen. Die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen über deren TZR-Komplex führt zur spezifischen Abtötung infizierter Zellen. Regulatorische T-Lymphozyten, die phänotypisch den T-Helferzellen ähnlich sind und in sehr geringer Anzahl im Blut vorkommen, wirken hingegen immunsuppressiv, da sie die Proliferation und Zytokinproduktion von Effektor-T-Zellen über nicht genau bekannte Mechanismen inhibieren können. NK-Zellen sind in der Lage, sowohl mit Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems zu interagieren und spielen somit eine wichtige Rolle in der Regulation von Immunprozessen. Da diese Brückenfunktion vor allem im Vergleich zwischen peripherem Blut und Gewebe derzeit im Mittelpunkt der NK-Zellforschung steht, wurde der Fokus dieser Arbeit auf den Phänotyp und die Funktion von

NK-Zellen am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis und der Gonarthrosen gelegt. Parallel wurden zwar auch adaptive Immunzellen, v.a. T-Lymphozyten, untersucht, worauf in dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen wird.



**Abb. 1 Schematische Darstellung der angeborenen und adaptiven Immunreaktionen**

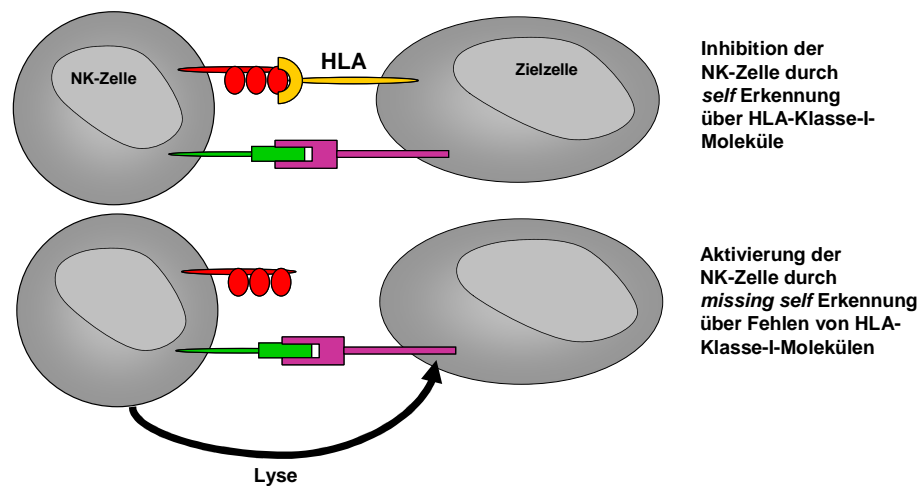
Dargestellt sind die Immunreaktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems am Beispiel einer Virusinfektion. Zunächst versuchen die Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Dendritische Zellen, Makrophagen und NK-Zellen die infizierten Körperzellen zu eliminieren. Gelingt dies nicht, setzen sie über die Produktion von Zytokinen und Chemokinen die Entzündungsreaktion in Gang und aktivieren spezifische T- und B-Zellen des erworbenen Immunsystems. B-Zellen differenzieren in Plasmazellen, die Antikörper des IgG-Typs produzieren. T-Helferzellen aktivieren über Zytokinproduktion v.a. zytotoxische T-Zellen, die die infizierten Zellen spezifisch abtöten können. Regulatorische T-Zellen tragen zur Suppression der Immunreaktion bei. Gerät diese Kaskade der verschiedenen Funktionen außer Kontrolle, so kann dies unter anderem zu autoimmunen Reaktionen führen.



## 1 Natürliche Killerzellen

NK-Zellen wurden das erste Mal vor mehr als 30 Jahren als „natürlich vorkommende Tumorzell-spezifische Killerzellen“ in der Maus beschrieben (Kiessling, Klein et al. 1975). NK-Zellen, die neben Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Granulozyten Teil der angeborenen Immunität sind, stellen große granuläre Lymphozyten dar, die aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark entstehen (Colucci, Caligiuri et al. 2003). Sie exprimieren keinen spezifischen Rezeptor wie T- und B-Lymphozyten, sondern werden über eine Vielzahl an aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren reguliert. Die wichtigste Rolle bei der Regulation von NK-Zellen spielen die humanen Leukozytenantigene der Klasse I (HLA). Alle HLA-Gene sind in dem Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) auf Chromosom 6p21.3 kodiert und können in zwei Klassen eingeteilt werden. HLA-Klasse-I-Moleküle präsentieren den CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in Form von 8-10 Aminosäuren langen Peptiden intrazelluläre Antigene und werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert. HLA-Klasse-II-Moleküle werden nur von immunregulatorischen Zellen, wie Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APC), z.B. Dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen exprimiert und präsentieren den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten 12-25 Aminosäuren lange extrazelluläre Antigene, welche zuvor internalisiert, verdaut und auf die HLA-Klasse-II-Moleküle geladen wurden. Für die Regulation der NK-Zellen spielen nur die HLA-Klasse-I-Moleküle eine Rolle (Lanier 1998, Moretta, Biassoni et al. 2000, Vivier and Anfossi 2004). HLA-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer schweren Kette mit drei extrazellulären Domänen, einer Transmembranregion und einem kurzen zytoplasmatischen Teil. Die schwere Kette assoziiert nicht-kovalent mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ <sub>2m</sub>). Von den klassischen HLA-Klasse-Ia-Molekülen, HLA-A, -B, und -C sind heutzutage 649, 1029 bzw. 350 Allele bekannt (IMGT/HLA Datenbank) (Robinson, Waller et al. 2003). Die zweite Gruppe stellen die weniger polymorphen HLA-Klasse-Ib-Moleküle HLA-E, -F und -G dar, deren Expression z.B. für HLA-G auf wenige Gewebe wie Plazenta und Keratinozyten beschränkt ist (Yelavarthi, Fishback et al. 1991, Ulbrecht, Maier et al. 2004). HLA-Klasse-I-Moleküle präsentieren in Abwesenheit einer Infektion, also im gesunden Normalzustand, Peptide von zelleigenen Proteinen auf der Oberfläche. Findet eine virale Infektion oder eine maligne Transformation statt, so werden virale oder tumorassoziierte Antigene präsentiert. Dies führt zur Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten, die die Zelle eliminieren. Viele Tumoren und Viren haben Mechanismen entwickelt, um die Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche zu

vermindern oder vollständig zu verhindern, wodurch die Zellen der Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten entgehen können (Natali, Nicotra et al. 1989, Pantel, Schlimok et al. 1991, Alcamí and Koszinowski 2000, Falk, Mach et al. 2002, Seliger, Cabrera et al. 2002). Diese „Lücke“ des Immunsystems kann von NK-Zellen geschlossen werden, da diese gerade Zielzellen mit verminderter HLA-Klasse-I-Expression erkennen und lysieren können, wie durch die *missing self*-Hypothese beschrieben wurde. 1981 formulierte Klas Kärre beim Verfassen seiner Dissertation diese Hypothese, welche er 1990 zusammen mit seinem ersten Doktoranden Hans-Gustaf Ljunggren publizierte (Kärre 1981, Ljunggren and Karre 1990). Sie konnten zeigen, dass NK-Zellen alle Zielzellen lysieren können, welche keine HLA-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, wohingegen die Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen eine Resistenz gegenüber der NK-Zelllyse lieferte (Abb. 2).

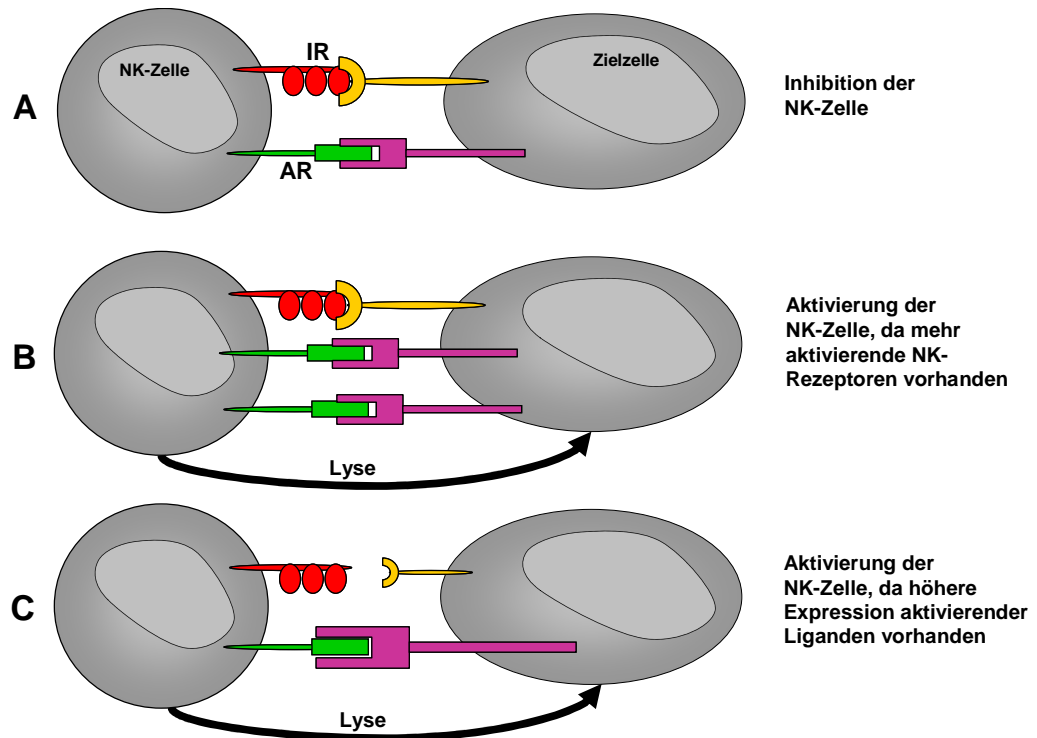


**Abb. 2 Aktivierung der NK-Zellen über die *missing self*-Erkennung**

NK-Zellen werden durch die Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche von Zielzellen in ihrer zytotoxischen Funktion gehemmt. Ist die HLA-Klasse-I-Expression auf den Zielzellen vermindert oder fehlt sie sogar vollständig, so werden die NK-Zellen aktiviert und lysieren die Zielzellen.

Der erste murine inhibitorische NK-Rezeptor Ly-49, über den die NK-Zellen MHC-spezifisch abgeschaltet werden können, wurde zwei Jahre nach der Postulierung der *missing self*-Hypothese entdeckt (Karlhofer, Ribaldo et al. 1992). In den folgenden Jahren wurden auch humane MHC-spezifische NK-Rezeptoren entdeckt, über welche die NK-Zellen inhibiert werden können (Moretta, Sivori et al. 1995, Moretta, Biassoni et al. 2000). Die Signale der inhibierenden NK-Rezeptoren stehen auf den NK-Zellen immer mit Signalen von aktivierenden Rezeptoren in einem Gleichgewicht. Gerät dieses Gleichgewicht zu Gunsten der aktivierenden Rezeptoren außer Balance, so kann der Überschuss an aktivierenden Signalen zu einer Aktivierung der NK-Zellen führen (Moretta, Bottino et al. 1996, Lanier 1998, Long 1999, Ravetch and Lanier 2000). Die NK-Zellen benötigen für ihre volle Funktionalität immer beide Arten an Rezeptoren und die Regulation der NK-Zellen wird

hierbei sowohl vom Expressionsmuster als auch von der Expressionsstärke der Rezeptoren beeinflusst. Einerseits kann die NK-Zelle selbst mehr aktivierende als inhibierende Rezeptoren exprimieren und so aktiviert werden, andererseits kann aber auch die Zielzelle mehr Liganden für aktivierende als für inhibierende NK-Rezeptoren exprimieren, was dann ebenfalls zu einer Aktivierung der NK-Zelle führt (Abb. 3).



**Abb. 3 Regulation der NK-Zellen durch inhibitorische und aktivierende NK-Rezeptoren**

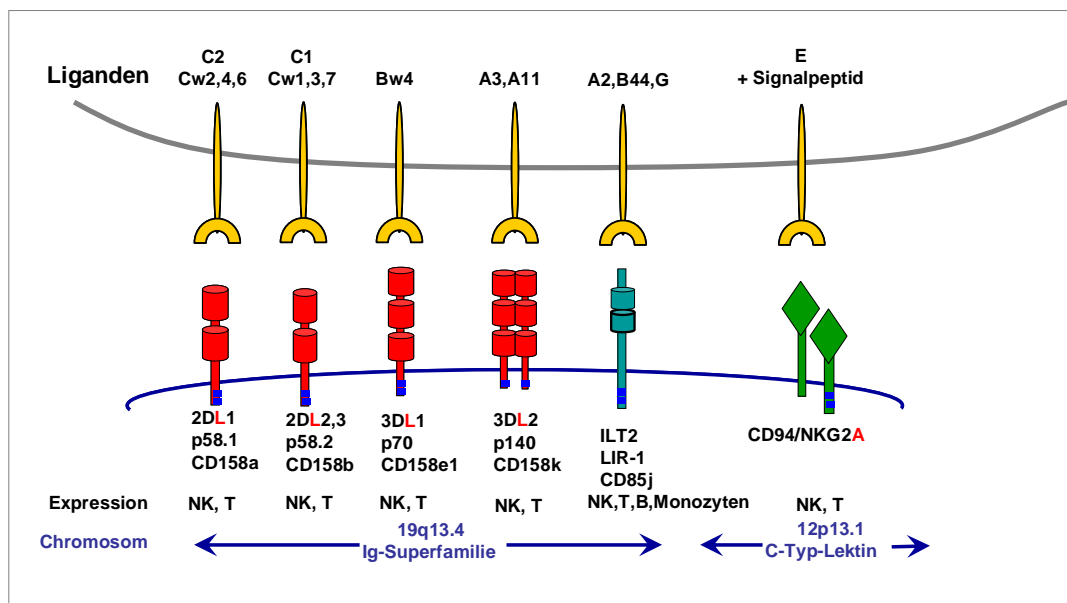
Vereinfachte Darstellung der Regulation von NK-Zellen. **A** Inhibierende (IR) und aktivierende (AR) NK-Rezeptoren stehen miteinander in einem Gleichgewicht. Sind die Liganden für die inhibierenden Rezeptoren vorhanden, führt das zu einer Inhibition der NK-Zelle. **B** Überwiegen die aktivierenden Rezeptoren auf den NK-Zellen, so kommt es zu einer Aktivierung der NK-Zelle und zu einer Lyse der Zielzelle. **C** Weisen die Zielzellen eine höhere Expression an aktivierenden als an inhibierenden Liganden auf, so kommt es ebenfalls zu einer Aktivierung der NK-Zelle.

Neben der Zytotoxizität wird über aktivierende (AR) und inhibierende (IR) Rezeptoren auch die zweite Effektorfunktion der NK-Zellen, die Zytokinfreisetzung reguliert. NK-Zellen sind dazu in der Lage Zytokine und Chemokine zu produzieren, insbesondere IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-10, RANTES, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  (Cooper, Fehniger et al. 2001, Robertson 2002)(M. Braun, C. Falk eigene Beobachtungen). Über die Freisetzung der Zytokine und Chemokine besitzen die NK-Zellen auch eine immunregulatorische Funktion, da sie so andere Immunzellen, wie z.B. T-Lymphozyten, stimulieren können und so die gesamte Immunreaktion in eine pro- oder anti-inflammatorische Richtung „dirigieren“ können.

## 1.1 NK-Rezeptoren

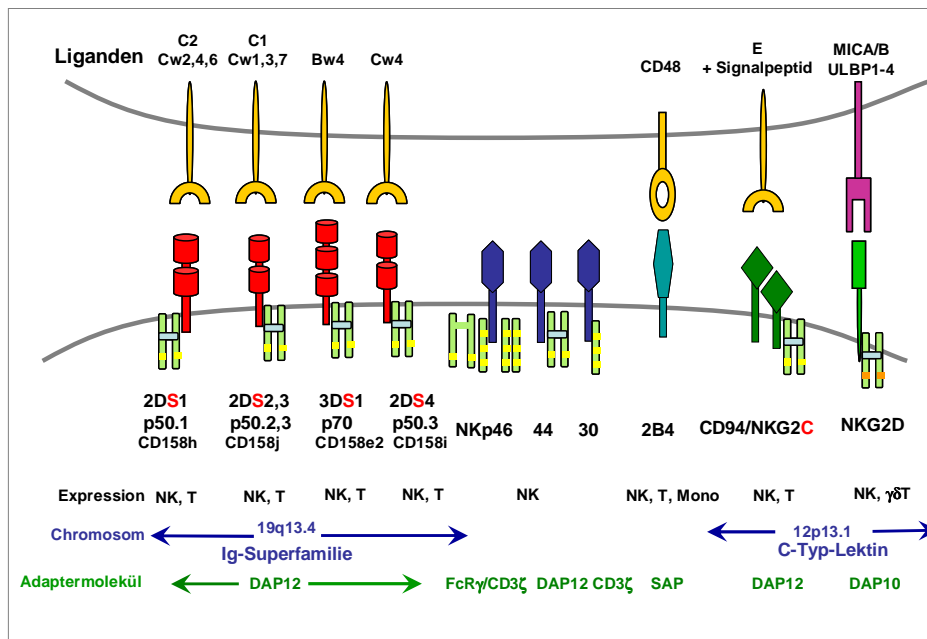
Es gibt drei große Familien an NK-Rezeptoren: die Killer-immunoglobulin-ähnlichen-Rezeptoren (KIR), die C-Typ-Lektin-Rezeptoren und die Natürlichen-Zytotoxizitäts-Rezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*, NCR) (Lanier 1998, Moretta, Biassoni et al. 2000). Die Gene werden hauptsächlich von dem Leukozyten-Rezeptor-Komplex (*leukocyte receptor complex*, LRC) auf Chromosom 19q13.4 und dem Natürlichen-Killerzell-Komplex (*natural killer cell complex*, NKC) auf Chromosom 12p13.1 kodiert. Neben diesen großen Gruppen gibt es noch die Ig-ähnlichen Transkripte (*Ig-like transcripts*, ILT/LIR), die ebenfalls im LRC lokalisiert sind.

Im Vergleich zur Regulation von T- und B-Lymphozyten ist die NK-Regulation viel komplexer, da hierbei die Signale vieler Rezeptoren miteinander integriert werden müssen. In den folgenden Abbildungen sind die wichtigsten inhibierenden (Abb. 4) und aktivierenden (Abb. 5) NK-Rezeptoren und ihre Liganden zusammengefasst.



**Abb. 4 Schematische Darstellung der inhibierenden Rezeptoren und ihrer Liganden.**

Zur KIR2/3DL-(CD158) Familie gehören die KIR2DL-Rezeptoren, welche die beiden HLA-C-Gruppen erkennen und die beiden KIR3DL-Rezeptoren, die Bw4- bzw. HLA-A3,A11-Moleküle binden. Zur ILT-Familie gehört ILT2, dessen Spezifität für HLA-G umstritten ist. Aus der C-Typ-Lektin-Familie ist das Heterodimer CD94/NKG2A als IR für NK- und T-Zellen bekannt, dessen Ligand HLA-E ist. In ihren langen zytosomatischen Domänen befinden sich die ITIM (blaue Kästchen), über die inhibitorische Signale weitergeleitet werden.



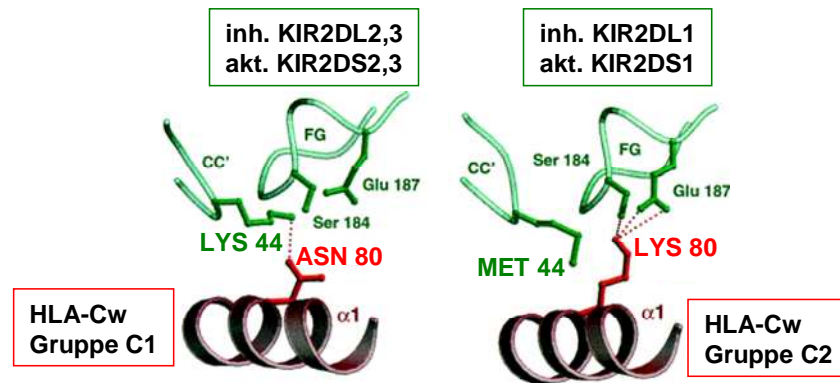
**Abb. 5 Schematische Darstellung der aktivierenden Rezeptoren und ihrer Liganden.**

Die kurzen Isoformen der KIR2/3DS-Moleküle erkennen dieselben HLA-C- und -B-Gruppen wie die langen KIR2/3DL-Moleküle. Da ihre kurzen intrazellulären Anteile keine Signaldomänen besitzen, wird für die positive Signaltransduktion die Hilfe von ITAM (gelbe Kästchen)-tragenden Adaptermolekülen wie CD3ζ benötigt. CD94 bindet neben dem inhibierenden NKG2A auch den aktivierenden NKG2C-Rezeptor, der ebenso an HLA-E bindet. NKG2D signalisiert über DAP10 (PI3K Bindungsstelle, orangene Kästchen), bindet MICA/B und ULBP1-4 und fungiert als Korezeptor für CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Der Korezeptor 2B4 erkennt den hämatopoetischen Zellmarker CD48 und signalisiert über den SAP-PI3K-Weg. Für die Nkp der NCR-Familie sind bislang keine Liganden bekannt.

Die Familie der KIR-Rezeptoren besteht aus 16 Genen, wobei zwei davon Pseudogene (KIR2DP1 und KIR3DP1) darstellen und nicht exprimiert werden. Die KIR-Gene können neben den NK-Zellen auch von γδ T-Lymphozyten und einer kleinen Subpopulation von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten exprimiert werden. KIR sind Typ-I-Transmembran-Glykoproteine mit zwei (KIR2D) oder drei (KIR3D) immunglobulin-ähnlichen Domänen. Die zytoplasmatische Region der Rezeptoren variiert in der Länge: einige Rezeptoren besitzen lange (L, *long*), andere kurze (S, *short*) zytoplasmatische Domänen. Die KIR mit langem zytoplasmatischen Teil (KIR2/3DL) besitzen dort eine oder zwei inhibierende ITIM (*immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif*)-Regionen, welche durch src-Kinasen (syk und fyn) phosphoryliert werden. Dadurch kommt es zu einer Rekrutierung von SHP1- und SHP2-Phosphatasen, die dann durch die Dephosphorylierung der beteiligten Signalmoleküle zur Abschaltung der Effektorfunktionen führen (Moretta, Mingari et al. 1996, Long 1999, Blery, Olcese et al. 2000, Lanier 2003). Die KIR mit kurzem zytoplasmatischen Teil (KIR2/3DS) besitzen in ihrer Transmembranregion positive geladene Aminosäuren, an die Adaptermoleküle mit aktivierenden ITAM (*immunoreceptor tyrosin-based activating motifs*)-Domänen binden können. Die Adaptermoleküle führen hier zur Transduktion von positiven Signalen, welche die Effektorfunktionen der NK-Zelle aktivieren. Die extrazellulären

Domänen der langen bzw. der kurzen Isoformen von KIR2DL/S1, KIR2DL/S2,3 und KIR3DL/S1 sind identisch, weshalb beim Nachweis an der Zelloberfläche mit spezifischen Antikörpern zwischen den aktivierenden und inhibierenden Formen nicht unterschieden werden kann.

Der KIR-Genlocus kann in zwei Haupt-Haplotypen, A und B, eingeteilt werden, wobei die so genannten „Framework“ KIR-Gene (3DL3, 3DP1, 2DL4 und 3DL2) bei jedem Haplotyp vorhanden sind. Die Einteilung in die zwei Gruppen A und B folgt hauptsächlich über das Vorhandensein oder das Fehlen von aktivierenden KIR Genen. Haplotyp A beinhaltet sechs inhibierende KIR-Gene (2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL1, 3DL2 und 3DL3) und nur ein aktivierendes KIR-Gen (KIR2DS4). Das KIR2DS4 Gen kann eine Deletion aufweisen und kann dann nicht exprimiert werden. Dieser Nullallel-Haplotyp enthält also gar keinen aktivierenden KIR und wird als AA bezeichnet. Haplotyp B ist sehr variabel und kann eine Vielzahl an Kombinationen aus aktivierenden und inhibierenden KIR-Genen beinhalten. Die Liganden der KIR stellen die klassischen HLA-Klasse-Ia-Moleküle HLA-A, -B und -C dar. Die bedeutendste Rolle spielen hierbei die HLA-C-Moleküle, deren zwei Allelgruppen (C1 und C2) sich in der  $\alpha$ 1-Domäne durch den Austausch von zwei Aminosäuren an den Positionen 77 und 80 unterscheiden (Ciccone, Pende et al. 1992, Biassoni, Falco et al. 1995, Winter, Gumperz et al. 1998, Colonna, Moretta et al. 2000, Natarajan, Dimasi et al. 2002). Die C1-Gruppe besitzt an Position 77 ein Serin und an Position 80 ein Asparagin und umfasst die HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8, -Cw12, -Cw14 und -Cw16 Allele. Die Allele der C2-Gruppe besitzen an Position 77 ein Asparagin und an Position 80 ein Lysin und beinhalten HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6, -Cw15 und -Cw17. Die Aminosäurepositionen 77 und 80 der HLA-C-Moleküle und die Aminosäureposition 44 der KIR (Lysin oder Methionin) entscheiden über die Spezifität der Bindung und stellen sicher, dass jeder KIR seinen spezifischen Liganden binden kann (Abb. 6). Andere KIR-Moleküle wie KIR3DL1 besitzen z.B. das HLA-Bw4-Supraepitop als Ligand, das bei ca. 50% der HLA-B-Allele vorhanden ist. HLA-Bw4 unterscheidet sich von HLA-Bw6 zwischen Position 76 und 83 der  $\alpha$ 1-Domäne ebenfalls in der Aminosäuresequenz. Nachdem die extrazellulären Domänen der inhibitorischen und aktivierenden KIR denselben Aufbau besitzen, ist die Ligandenspezifität nahezu identisch, wobei Ausnahmen beschrieben sind (Stewart, Laugier-Anfossi et al. 2005). Die inhibitorischen KIR binden ihre HLA-Klasse-Ia-Liganden jedoch mit einer wesentlich höheren Affinität als die entsprechenden aktivierenden KIR (Saulquin, Gastinel et al. 2003).



**Abb. 6 Dimorphismus in  $\alpha 1$ -Domäne der HLA-C Moleküle entscheidet über KIR-Bindung**

HLA-C-Moleküle besitzen in ihrer  $\alpha 1$ -Domäne ein Asparagin oder ein Lysin an Position 80. Diese Aminosäure entscheidet in Kombination mit der Aminosäure an Position 44 der KIR-Moleküle (Methionin oder Lysin) über die Interaktion der Rezeptoren mit ihren Liganden. Die inhibierenden KIR2DL2 und KIR2DL3 binden mit höherer Affinität als ihre aktivierenden Isoformen (KIR2DS2 und KIR2DS3) an die HLA-Cw C1-Gruppe. Die inhibierenden KIR2DL1 bindet mit höherer Affinität als die aktivierende Isoform KIR2DS1 an die HLA-Cw C2-Gruppe. Adaptiert nach Boyington et al. (Boyington and Sun 2002)

In der Gruppe der C-Typ-Lektin-Rezeptoren befinden sich ebenfalls aktivierende und inhibierende Rezeptoren. Das Heterodimer CD94/NKG2A stellt den inhibitorischen Rezeptorkomplex dar, wobei CD94 das nicht-klassische MHC-Klasse-Ib-Molekül HLA-E als Liganden erkennt und NKG2A über seine zytoplasmatische Domänenstruktur das inhibitorische Signal vermittelt. Das aktivierende Heterodimer CD94/NKG2C erkennt ebenfalls das nicht-klassische HLA-E-Molekül (Lazetic, Chang et al. 1996, Braud, Allan et al. 1998, Lopez-Botet, Llano et al. 2000). NKG2C unterscheidet sich wie die KIR von der inhibitorischen Isoform NKG2A nur in der zytoplasmatischen Domäne, welche keine ITIM-Sequenzen enthält. NKG2C bindet mit seiner positiven Aminosäure in der TM-Region an das Adaptermolekül DAP12, welches die positive Signalkaskade initiiert. Ein weiterer Vertreter der C-Typ-Lektin-Familie stellt das aktivierende Homodimer NKG2D dar, das die MHC-Klasse-I-ähnlichen Moleküle MICA, MICB und ULBP1-4 (*retinoic acid early transcript* RAET1I/N/H/E) binden kann und über das Adaptermolekül DAP10 die Effektorfunktionen aktiviert (Vivier, Tomasello et al. 2002, Cerwenka and Lanier 2003, Raulet 2003, Lanier 2005). NKG2D wird neben NK-Zellen auch auf CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> und  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Lymphozyten exprimiert. Auf NK-Zellen stellt NKG2D einen unabhängigen aktivierenden Rezeptor dar, auf T-Lymphozyten scheint er jedoch nur kostimulatorische Fähigkeiten zu besitzen und ist alleine nicht dazu in der Lage die Zellen zu aktivieren (Groh, Rhinehart et al. 2001, Ho, Carayannopoulos et al. 2002, Billadeau, Upshaw et al. 2003, Zompi, Hamerman et al. 2003, von Geldern, Simm et al. 2006). In dieser Arbeit wurde die Funktionalität von NKG2D anhand des Liganden ULBP4 (RAET1E) untersucht. ULBP4 gehört zur Familie der UL-16 Bindeproteine, welche ursprünglich durch die Interaktion von ULBP1 und ULBP2 mit dem

UL-16 Glykoprotein des humanen Cytomegalie-Virus (HCMV) identifiziert wurden (Cosman, Mullberg et al. 2001). ULBP-Moleküle besitzen eine HLA-Klasse-I-ähnliche  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domäne, aber keine  $\alpha 3$ -Domäne und ULBP1-3 sind über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Membran verankert. ULBP4 dagegen besitzt einen TM-Teil und wird vor allem in der Haut exprimiert (Chalupny, Sutherland et al. 2003), weshalb es in dieser Arbeit anfänglich für die Untersuchung von Hautgewebe der Psoriasis-Patienten gedacht war und später als zusätzlicher NKG2D-Stimulus für Funktionsanalysen von NK-Zellen eingesetzt wurde.

Die dritte Gruppe der NK-Rezeptoren stellt die Familie der Natürlichen-Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCR) dar (Moretta, Bottino et al. 2001), welche wie die KIR zur Ig-Superfamilie gehören und die Rezeptoren NKp46, NKp30 und NKp44 umfassen. Diese Rezeptoren stellen im Gegensatz zu den KIR- und C-Typ-Lektin-Rezeptoren die einzig wirklichen NK-Zell-spezifischen Rezeptoren dar. NKp46 und NKp30 werden auf allen NK-Zellen konstitutiv, NKp44 dagegen nur nach Aktivierung exprimiert (Vitale, Bottino et al. 1998). Die humanen Liganden dieser Rezeptoren sind noch nicht bekannt, aber einige virale Liganden wurden bereits identifiziert (Arnon, Lev et al. 2001, Mandelboim, Lieberman et al. 2001). Die Beteiligung der NCR an der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität konnte durch Blockierung der Rezeptoren nachgewiesen werden. Die Expressionsstärke von NKp46 korreliert direkt mit der Stärke der Zytotoxizität. Die Signaltransduktion erfolgt hierbei über die Adaptermoleküle DAP12 bzw. CD3 $\zeta$ , die ITAM-Domänen besitzen. Durch die Phosphorylierung der Tyrosinreste von Tyrosinkinasen der ZAP70/Syk-Familie wird dann die Signalkaskade initiiert.

Neben diesen drei großen Rezeptorgruppen gibt es noch die Gruppe der Ig-ähnlichen Transkripte (*Ig-like transcripts*, ILT/LIR, CD85), zu denen der inhibitorischer Rezeptor ILT2 (LIR-1) gehört. ILT2 scheint unter anderem das HLA-Klasse-Ib-Molekül HLA-G zu erkennen (Fanger, Cosman et al. 1998, Lopez-Botet, Navarro et al. 1999, Hofmeister and Weiss 2003). ILT2 kann neben NK-Zellen auch auf manchen T-Zellen, B-Zellen und Monozyten exprimiert sein.

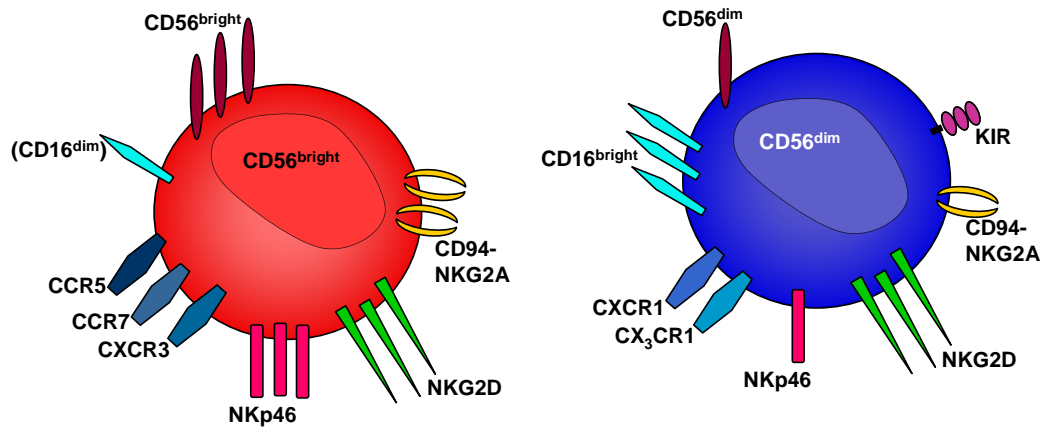
Einen weiteren aktivierenden Rezeptor stellt der Rezeptor 2B4 (CD244) dar, welcher zur CD2/CD150-Familie zählt und als Korezeptor für NK- und T-Zellen identifiziert wurde. Er erkennt CD48 und besitzt zwei Ig-ähnliche Domänen und einen langen zytoplasmatischen Teil. Der große Unterschied zu den anderen aktivierenden Rezeptoren stellt hier die Signaltransduktion über das Adaptermolekül SAP und den Phosphatidylinositol-3-Kinase



(PI3K)-Weg dar. Zudem wird 2B4 auf Chromosom 1p13 kodiert, und nicht wie die bisher erwähnten Rezeptoren im NKC auf Chromosom 12p13.1 (C-Typ-Lektin-Familie) (Yokoyama and Plougastel 2003) oder dem LRC (KIR-und ILT-Familie) auf Chromosom 19q13.4 (Young, Canavez et al. 2001, Martin, Kulski et al. 2002).

## 1.2 NK-Zell-Subpopulationen

NK-Zellen stellen etwa 5-10 % der humanen Lymphozyten dar. Phänotypisch werden sie durch die Expression von CD56 und das Fehlen des CD3-Komplexes (CD3 $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ ) definiert (Robertson and Ritz 1990). Die CD3 $\zeta$ -Kette hingegen kann als Signal-Adapter bei einigen NK-Rezeptoren fungieren (Abb. 5, aktivierende NK-Rezeptoren). CD56 ist eine Isoform des neuralen Zelladhäsionsmoleküls (*neural-cell adhesion molecule*, NCAM), dessen Funktion auf NK-Zellen nicht eindeutig definiert ist. Einige sehr frühe Studien vermuteten die CD56-vermittelte Interaktion von NK-Zellen mit ihren Zielzellen (Nitta, Yagita et al. 1989, Suzuki, Suzuki et al. 1991). Aufgrund der Expressionsdichte von CD56 können NK-Zellen jedoch in zwei Subpopulationen eingeteilt werden, die sich auch in der Expression weiterer Oberflächenmarker unterscheiden (Abb. 7). Die Mehrheit ( $\approx 90$  %) der peripheren NK-Zellen exprimiert CD56 in geringer und CD16 in hoher Dichte und stellt die „CD56<sup>dim</sup>“ Subpopulation dar. Die restlichen NK-Zellen ( $\approx 10$  %) exprimieren CD56 in sehr hoher Dichte und sind meistens CD16 negativ („CD56<sup>bright</sup>“ Subpopulation). CD16 ist der niedrig affine Fc $\gamma$ -Rezeptor III (Fc $\gamma$ RIII) und stellt auf NK-Zellen einen bedeutenden aktivierenden Rezeptor dar. Über CD16 binden NK-Zellen an den Fc-Teil von IgG, das an Zielzellen gebunden ist. CD16 vermittelt über ITAM-Regionen assoziierter Untereinheiten, wie CD3 $\zeta$ , die Lyse der IgG-markierten Zielzelle, was als antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität der NK-Zellen (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) beschrieben ist (Leibson 1997).

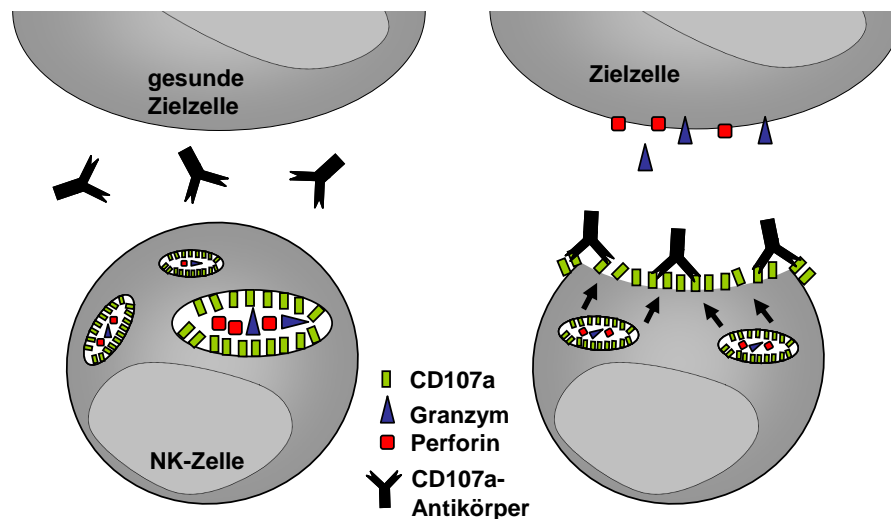


**Abb. 7 NK-Zell-Subpopulationen**

90% der peripheren NK-Zellen exprimieren CD56<sup>dim</sup> und 10 % exprimieren CD56<sup>bright</sup>. Die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen weisen eine hohe Expression an CD16 (Fcγ-Rezeptor III) und KIR auf und exprimieren CD94/NKG2A schwächer als die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. Diese exprimieren meistens kein CD16. CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen sind immer KIR-negativ, zeigen aber eine hohe CD94/NKG2A-Expression. NKG2D und NKp46 werden von allen NK-Zellen exprimiert. Zudem zeigen die NK-Subpopulationen eine unterschiedliche Expression an Chemokinrezeptoren (CD56<sup>bright</sup>: u.a. CCR5, CCR7, CXCR3/CD56<sup>dim</sup>: u.a. CXCR1, CX<sub>3</sub>CR1).

Auch die unter 1.1 beschriebenen inhibierenden und aktivierenden NK-Rezeptoren zeigen unterschiedliche Expression auf den NK-Subpopulationen (Colonna, Navarro et al. 1997, Voss, Daley et al. 1998, Andre, Spertini et al. 2000). CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen weisen eine hohe KIR-Expression auf und zeigen ein moderates Expressionsniveau von NKG2A. CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen sind hingegen KIR-negativ und exprimieren NKG2A sehr stark. Beide NK-Subpopulationen exprimieren NKG2D und NKp46. CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimieren konstitutiv den hoch affinen Rezeptorkomplex für IL-2 (CD25/CD122) (Caligiuri, Zmuidzinas et al. 1990, Nagler, Lanier et al. 1990), wodurch CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nach einer Stimulation mit IL-2 stärker proliferieren. Neben der unterschiedlichen Rezeptorexpression weisen die Subpopulationen auch unterschiedliche Effektorfunktionen auf. Erste Studien zeigten, dass die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen die vorwiegend zytotoxische Subpopulation darstellen und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen dagegen in der Lage sind, hohe Zytokinmengen freizusetzen (Nagler, Lanier et al. 1989). CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen besitzen aufgrund der hohen CD16-Expression eine höhere ADCC-Aktivität (Nagler, Lanier et al. 1989) und der hohe Gehalt an lytischen Granula trägt ebenfalls zu einem erhöhtem zytotoxischen Potential bei. CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zeigen nach einer Stimulation mit IL-2 oder IL-12 jedoch die gleiche zytotoxische Aktivität (Caligiuri, Zmuidzinas et al. 1990, Nagler, Lanier et al. 1990, Robertson, Soiffer et al. 1992). Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen ebenfalls zytotoxisch gegenüber HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen reagieren. Die zytotoxischen Effektormechanismen von NK-Zellen zeichnen sich durch die Polarisation lytischer Granula zu der Kontaktstelle mit der Zielzelle aus, wonach die Zytotoxine, Perforin und Granzym A/B

ausgeschüttet werden und in der Zielzelle zu Apoptose führen. Dieser Vorgang ist mit der Fusion der Vesikel- und der Zellmembran verbunden. Daher lassen sich degranulierende (zytotoxische) NK-Zellen durch die transiente Anwesenheit des Granula-Markers LAMP-1 (CD107a) durchflusszytometrisch identifizieren (Abb. 8). Die Kombination des CD107a-Markers mit CD16, CD56 und CD3ε (Ausschluss der T-Zellen) erlaubt eine kombinierte Analyse von Phänotyp und Funktion, die in dieser Arbeit einen zentralen Aspekt darstellt.



**Abb. 8 Degranulation von NK-Zellen und Detektion des CD107a-Moleküls**

Nach der Erkennung einer HLA-Klasse-I-negativen Zielzelle (Tumorzelle) polarisieren sich die lytischen Granula der NK-Zellen, welche Perforin und Granzyme enthalten, an der Kontaktstelle und fusionieren mit der Zellmembran. Dabei gelangt der LAMP-1 (CD107a) transient auf die Zelloberfläche, wo er durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann. Die daraus resultierende Fluoreszenzintensität ist proportional zum Ausmaß der Degranulation und kann auf Einzelzellniveau nachgewiesen werden.

CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen produzieren im Gegensatz zu den CD56<sup>dim</sup> Zellen Zytokine wie IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-13 und GM-CSF (Cooper, Fehniger et al. 2001). Neuere Studien und Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass das Zytokinrepertoire der NK-Zellen noch erweitert werden kann und dass prinzipiell alle NK-Zellen nach Stimulation mit HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen oder über Zytokine, wie IL12 und IL15, dazu in der Lage sind, Zytokine zu produzieren. Die Rollenverteilung zwischen den NK-Subpopulationen kann deshalb nicht mehr so klar definiert werden. Aus diesem Grund werden die NK-Subpopulationen deshalb nun als „zielzell-sensitiver“ und „zytokin-sensitiver“ bezeichnet (Anfossi, Andre et al. 2006). In jüngster Zeit wurde eine neue, in Tonsillen (Mandeln) lokalisierte NK-Population (NK-22) identifiziert, die die immunregulatorischen Zytokine wie LIF, IL-22 und IL-26 produzieren (M. Colonna, NK-Meeting, Bad Herrenalb 2008). Diese Plastizität der NK-Zellen bezüglich ihrer Zytokinproduktion bietet die Grundlage für die Neubewertung ihrer Rolle in Autoimmunität und Tumorbekämpfung. Die zwei NK-Zell-Subpopulationen unterscheiden

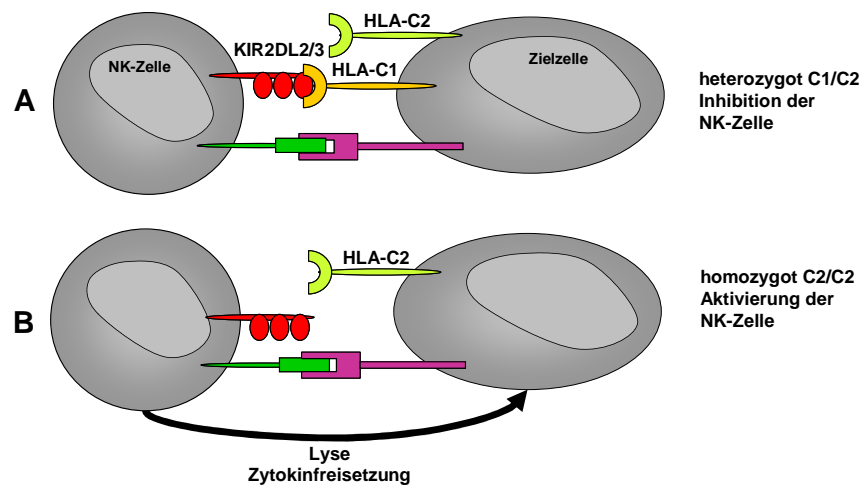
sich außerdem in der Expression von Chemokinrezeptoren, welche für die Wanderung der NK-Zellen verantwortlich sind. Neben der hohen Expression von CXCR3, dem Rezeptor für CXCL10 (IP-10, IFN $\gamma$ -induzierbares Protein) exprimieren CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen interessanterweise CCR7, den Rezeptor für CCL7 (MIP3 $\beta$ ), welcher normalerweise die Rekrutierung von aktivierten T-Lymphozyten in sekundäre lymphoide Organe (Lymphknoten) vermittelt. Zusammen mit der hohen Expression des Adhensionsmoleküls CD62L (L-Selektin) könnte CCR7 die Rekrutierung von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in die Lymphorgane bewirken. Es wurde bereits beobachtet, dass diese NK-Zell-Subpopulation präferentiell in nicht-reaktiven Lymphknoten zu finden ist (Fehniger, Cooper et al. 2002). Des Weiteren exprimieren CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen CCR5, den Rezeptor für CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) und CCL5 (RANTES). CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimieren unter anderem CXCR1, den Rezeptor für CXCL8 (IL-8) und CX<sub>3</sub>CR1, den Rezeptor für CX3CL1 (Fraktalkin). Die Untersuchungen bezüglich der CCR- und CXCR-Expression auf NK-Zellen müssen jedoch immer kritisch betrachtet werden, da die Expression der Rezeptoren zum Beispiel stark vom Aktivierungszustand der Zellen abhängt (Robertson 2002). Die unterschiedliche Expression der Rezeptorexpression führt unter anderem auch zu einer unterschiedlichen Gewebeverteilung der zwei NK-Zell-Subpopulationen. So konnte schon eine Anreicherung der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit von entzündeten Gelenken und in nicht-reaktiven Lymphknoten beobachtet werden (Dalbeth and Callan 2002, Fehniger, Cooper et al. 2002). Zudem ist die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellpopulation teilweise in einige Tumoren, wie z.B. dem Nierenzellkarzinom, verstärkt zu finden (Schleypen, Baur et al. 2006).

## 2 NK-Zellen und Autoimmunität

Zytokine spielen bei der Entwicklung von Immunzellen, bei der Regulation von Immunprozessen und bei der Regulation von Effektorfunktionen der Immunzellen eine große Rolle. Es existieren viele Studien über die Rolle von Zytokinen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunkrankheiten, wobei sie sowohl proinflammatorisch als auch immunsuppressiv wirken können und in komplexen Netzwerken miteinander in Bezug stehen. Da NK-Zellen neben vielen anderen Immunzellen auch dazu in der Lage sind, Zytokine zu produzieren und ihre Rolle diesbezüglich in Autoimmunkrankheiten noch nicht definiert ist, wurde der Fokus in dieser Arbeit auf diesen Aspekt gelegt. Anfangs wurden die NK-Zellen ausschließlich als Teil der angeborenen Immunität angesehen, welche einen der ersten Abwehrmechanismen gegen Infektionen darstellt. Infektionen spielen jedoch auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und so kann über die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems ebenfalls das adaptive Immunsystem in Richtung Autoimmunität beeinflusst werden (Fearon and Locksley 1996, Shi, Ljunggren et al. 2001, McClain, Heinlen et al. 2005, Pulendran and Ahmed 2006). Es ist schwierig, diese Interaktionsprozesse genau zu untersuchen, da es nahezu unmöglich ist, Individuen zu identifizieren, die sich gerade in der Induktionsphase einer Autoimmunkrankheit befinden, die möglicherweise der angeborenen Immunität bei einer Infektion entspricht (Abb. 1). NK-Zellen können einerseits direkten Kontakt mit Dendritischen Zellen eingehen, was dabei zu einer gegenseitigen Aktivierung führen kann (Gerosa, Baldani-Guerra et al. 2002, Piccioli, Sbrana et al. 2002). Andererseits sind sie auch dazu in der Lage, Dendritische Zellen zu lysieren (Shah, Gilbertson et al. 1985), wodurch die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen durch die Selbst-Antigen-Präsentation und die Entstehung von autoimmunen Prozessen verhindert werden könnte. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass NK-Zellen die Proliferation und Aktivierung von B-Zellen beeinflussen können (Kimata, Shanahan et al. 1987, Blanca, Bere et al. 2001). Dadurch kann die Stimulation der Autoantikörperproduktion als Teil der autoimmunen Reaktion angeregt werden (Shi, Wang et al. 2000). Andererseits wurde in Mausmodellen gezeigt, dass das Fehlen von NK-Zellen mit schweren Verlaufsformen von experimenteller autoimmuner Encephalomyelitis und  $CD4^+$  T-Zell-vermittelter Kolitis ulcerosa (Morbus Crohn) korreliert werden kann. Dies lässt vermuten, dass NK-Zellen in diesem Kontext die Proliferation und Zytokinproduktion der autoreaktiven T-Zellen inhibieren (Zhang, Yamamura et al. 1997, Fort, Leach et al. 1998). In einem  $IL18^{-/-}$  Mausmodell für Myasthenia gravis (schwere autoimmune Muskelschwäche) wurde hingegen

publiziert, dass eine erniedrigte NK-Zell-Frequenz die Entwicklung von  $T_H1$ -Zellen und somit die autoimmune Antikörper-Antwort stören kann (Shi, Takeda et al. 2000). Interessanterweise konnte in diesem Modell der NK-Zelleffekt nur in der Initiationsphase der Krankheit beobachtet werden, hatte zu einem späteren Zeitpunkt der Krankheit jedoch keine Auswirkungen mehr. Diese differentielle Rolle von NK-Zellen in der Induktions- versus der Effektorphase der Immunantwort konnte auch an verschiedenen Tumormodellen beobachtet werden (Adam, King et al. 2005), wodurch der „dirigierende“ Charakter der NK-Zellfunktion zu Beginn einer Immunreaktion verdeutlicht wird. Ein weiteres Mausmodell bestätigte, dass eine Expansion der NK-Zellen zu Beginn einer Autoimmunkrankheit stattfindet, zu einem späteren Zeitpunkt aber eine Degeneration der NK-Zellen zu beobachten ist (Liu, Van Kaer et al. 2006). Die NK-Zellen könnten also am Anfang durch die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen zur Etablierung der Autoimmunreaktion und damit der Erkrankung beitragen. Nach der Initiation der autoimmunen Reaktion könnte das Immunsystem entweder durch die Verringerung der NK-Zellen oder durch die Änderung ihrer Aktivität eine fortlaufende positive Rückkopplung der Aktivierungsschleife verhindern und so einen Mechanismus besitzen, um ausufernde autoimmune Prozesse unter Kontrolle zu halten. Bei einigen Autoimmunkrankheiten wurde bereits eine verringerte NK-Frequenz in der Peripherie detektiert, darunter auch bei Psoriasis vulgaris (Cameron, Kirby et al. 2003) und bei juveniler Rheumatoider Arthritis (Wouters, Ceuppens et al. 2002). Es ist aber noch nicht geklärt, ob die verringerte NK-Frequenz im Zuge der Erkrankung und ihrer Behandlung entsteht oder ob sie direkt an der Entstehung beteiligt ist. Bei Multipler Sklerose konnte jedoch ein Zusammenhang mit der NK-Frequenz und den Schüben der Krankheit beobachtet werden (Munschauer, Hartrich et al. 1995, Kastrukoff, Morgan et al. 1998), was hier wiederum eine direkte immunregulatorische Beteiligung der NK-Zellen am Krankheitsverlauf vermuten lässt. In den meisten dieser humanen Studien wurde jedoch ausschließlich die Frequenz der peripheren NK-Zellen untersucht, von welcher man aber nicht auf die Anzahl der NK-Zellen in den Zielorganen schließen kann. Im Vergleich zwischen der humanen Situation und den Mausmodellen ist es wichtig zu erwähnen, dass der KIR-Genlocus nur in Primaten vorkommt und die NK-Zellen der Maus ausschließlich über den C-Typ-Lektin-Rezeptor-Komplex reguliert sind. Diese, im Vergleich mit der hohen Homologie aller anderen Immunkomponenten, ungewöhnliche Diskrepanz erschwert zusätzlich die Übertragbarkeit muriner Autoimmun-Modelle bezüglich des NK-Zellaspekts auf den Menschen. Bei Autoimmunkrankheiten spielen die KIR NK-Rezeptoren und ihre Liganden, die HLA-Klasse-I-Moleküle, eine wichtige Rolle. Die Expression des aktivierenden KIR2DS2 korreliert z.B.

mit einem erhöhten Risiko für Rheumatoide Vaskulitis (Yen, Moore et al. 2001). Die Kombination des aktivierenden KIR2DS1 (und/ oder KIR2DS2) mit einem homozygoten HLA-C Phänotyp scheint das Entstehen von Psoriasis Arthritis zu begünstigen (Nelson, Martin et al. 2004). Dies könnte an einer verringerten Inhibition der NK-Zellen liegen, da bei Individuen mit homozygotem HLA-C2-Phänotyp die Liganden für die inhibierenden KIR2DL2/3 Rezeptoren fehlen und bei Individuen mit homozygotem HLA-C1-Phänotyp entsprechend der Ligand für den inhibierenden KIR2DL1 Rezeptor fehlt (Vgl. Abb. 6 und Abb. 9).



**Abb. 9 Kombination an HLA- und KIR-Molekülen beeinflussen autoimmune Prozesse**

Bei Individuen, die HLA-C Moleküle der C1- und C2-Gruppe exprimieren, werden NK-Zellen, welche KIR2DL2 und/oder KIR2DL3 exprimieren durch die Bindung des Liganden HLA-C1 inhibiert (A). Einem Individuum, das homozygot für die HLA-C C2-Gruppe ist, fehlt der Ligand für diese inhibierenden NK-Rezeptoren (B). In diesem Kontext kann es zur Aktivierung der NK-Zelle kommen, welche dann an autoimmunen Prozessen beteiligt sein kann.

Es wurde bereits in Studien mit peripherem Blut gezeigt, dass KIR im autoimmunen Kontext auch als kostimulatorische Moleküle auf T-Zellen exprimiert sein können. So wurden unter anderem bei Rheumatoiden Arthritis-Patienten  $CD4^+CD28^-KIR^+$  T-Zellen entdeckt (Warrington, Takemura et al. 2001). Es ist also noch unklar, ob die KIR-Expression kostimulatorisch auf autoreaktiven T-Zellen wirkt oder ob die Aktivierung der NK-Zellen selbst zu den autoimmunen Prozessen beiträgt. Obwohl einige widersprüchliche Ergebnisse vorliegen, ist es inzwischen im immunologischen Bereich unumstritten, dass NK-Zellen zur Regulation autoimmuner Prozesse beitragen. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit die Rolle der NK-Zellen im Kontext autoimmuner Gelenkerkrankungen detailliert in Bezug auf ihren Phänotyp und ihre Funktion untersucht werden.

### 3 Autoimmune und nicht-autoimmune Gelenkerkrankungen

Für die Untersuchung der NK-Zellen im autoimmunen Kontext wurden in dieser Arbeit autoimmune mit nicht-autoimmunen Gelenkerkrankungen verglichen. Die autoimmunen Gelenkerkrankungen wurden aufgrund ihrer starken Entzündungsreaktionen hier vereinfacht als Arthritiden zusammengefasst. Medizinisch gesehen bezeichnet „Arthritis“ eine Gelenkentzündung im Allgemeinen. Das Kontrollkollektiv stellten Arthrose-Patienten dar (Gonarthrosen: Arthrosen des Kniegelenks), welche keinen autoimmunen Hintergrund besitzen. Das Arthritis-Patientenkollektiv bestand hauptsächlich aus Rheumatoiden Arthritis-Patienten. Zudem enthielt das Kollektiv fünf Patienten mit einer undifferenzierten Poly- bzw. Oligoarthritis und fünf Patienten mit nicht eindeutig zuzuordnenden Diagnosen, d.h. bei diesen Patienten war unklar, ob sie überhaupt einen autoimmunen Kontext besitzen. Zu dem Kollektiv der Arthritiden gehörten auch zwei Patienten mit Reaktiver Arthritis (Arthritis nach einer bakteriellen oder viralen Infektion) und drei weitere stark entzündliche, aber nicht-autoimmune Erkrankungen: die Lyme-Arthritis (Gelenkentzündung nach Infektion mit dem Bakterium *Borrelia burgdorferi*), die aktivierte Arthrose (Entzündung des Gelenks auf der Grundlage einer Arthrose) und die Arthritis urica (Gicht, Stoffwechselkrankheit mit Ablagerung von Harnsäurekristallen in Gelenken).

#### 3.1 Arthrose

Arthrose ist eine rein degenerative nicht-autoimmune Gelenkerkrankung, die mit dem Abbau des Knorpels- bzw. sogar des Knochengewebes im Gelenk einhergeht. In Deutschland leiden ca. 8 % der über 50-Jährigen an symptomatischer Arthrose, wobei häufig Kniegelenke betroffen sind. Arthrosen stellen einen Gelenkverschleiß dar, der durch ein Missverhältnis zwischen Belastung und Belastbarkeit entsteht, das z.B. durch Fehlstellungen, Gelenktraumata oder Alterungsprozesse verursacht wird. Zunächst ist der Knorpel vom Verschleiß betroffen, es können jedoch auch Veränderungen des Knochens auftreten, welche zur Bildung von Geröllzysten (Flüssigkeitsgefüllten Hohlräumen im Knochen) und Osteophyten (Bildung von unstrukturierten Knochenvorsprüngen am Gelenk) führen können. Arthrosen werden rein medizinisch gesehen nicht als Entzündungen betrachtet. Immunologisch gesehen findet jedoch tatsächlich eine Entzündung statt, wenn auch eine schwache, da in der Synovialflüssigkeit ein Infiltrat an Immunzellen vorliegt und proinflammatorische Zytokine produziert werden. Es ist derzeit leider nicht möglich, diese leichte immunologische



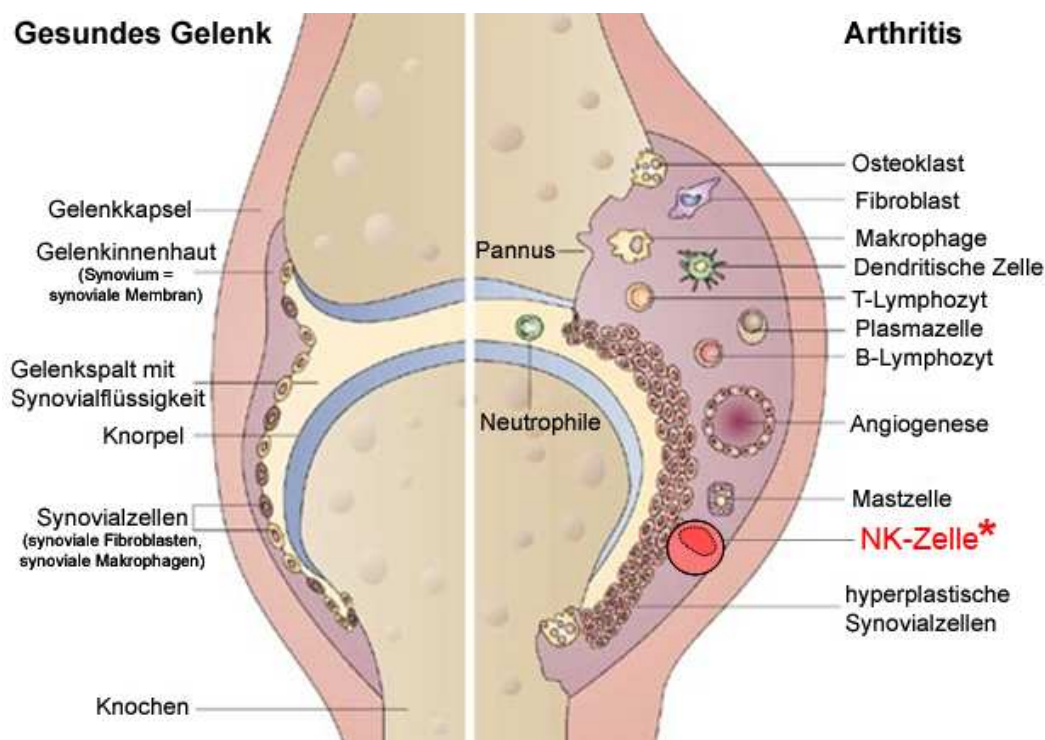
Entzündung von einem vollkommen gesunden Kniegelenk zu unterscheiden, da von gesunden Spendern unter keinen Umständen Synovialflüssigkeit entnommen werden kann.

### 3.2 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische Polyarthritis, die etwa 1 % der Bevölkerung betrifft und in der Regel einen schubförmigen Verlauf zeigt. Die RA führt zur Schädigung der synovialen Membran, des Knorpels und des Knochens in den Gelenken (Abb. 10), bei 15 % der Patienten kann sich die Entzündungsreaktion jedoch auch außerhalb der Gelenke manifestieren (Turesson, O'Fallon et al. 2003). 80 % der Patienten sind seropositiv für die sogenannten Rheumafaktoren, welche Antikörper darstellen, die an die Immunglobulin-Fc-Fragmente von IgG-Antikörpern binden können (Franklin, Holman et al. 1957, Zvaifler 1973). Neben diesen Rheumafaktoren treten aber noch weitere von B- oder T-Zellen erkannte Autoantigene und Autoantikörper bei RA auf (Schellekens, de Jong et al. 1998, Smolen and Steiner 2001, Fritsch, Eselbock et al. 2002). Dieser Befund machte die Rheumatoide Arthritis zu einer Erkrankung mit autoimmunem Kontext, an deren Entstehung autoreaktive Antikörper beteiligt sind. Die RA ist zudem stark mit dem Vorhandensein einer bestimmten Region in der  $\beta$ -Kettenregion (DRB) der HLA-DR-Molekülen assoziiert (Nepom, Byers et al. 1989). Neben dieser genetischen Komponente wurden schon früh die Zytokinnetzwerke bei RA untersucht und heute weiß man, dass Zytokine direkt an den Immunprozessen zur Entstehung der RA beteiligt sind (McInnes and Schett 2007). Anfänglich wurde die Rheumatoide Arthritis als eine  $T_H1$ -vermittelte Krankheit angesehen, die vorwiegend durch eine T-Zellpopulation ( $T_H1$ -Zellen) angetrieben wird, welche proinflammatorische Zytokine wie  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  produziert (Schulze-Koops and Kalden 2001). Neuere Untersuchungen stellen jedoch die prominente Rolle der  $T_H17$ -Zellen an der Entstehung von RA heraus, welche mit  $T_H1$ -Zellen verwandt sind, als Leitzytokin jedoch IL-17 produzieren (Chabaud, Durand et al. 1999, Lubberts, Koenders et al. 2005). Diese IL-17-Produktion stößt nach der derzeitigen Vorstellung eine dominoartige Kettenreaktion aus der Aktivierung von T-Zellen und Monozyten/Makrophagen an, die schlussendlich in der Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten mündet. Dieser als Osteoklastogenese bezeichnete Vorgang ist der Auslöser der Knorpel- und Knochenzerstörung, da Osteoklasten dessen Abbau fördern und den Knochen- und Knorpelaufbauenden Osteoblasten entgegenwirken. Die Entzündungsreaktionen, welche durch die Immunzellen im Gelenk vermittelt werden, sind schematisch unter 3.3 (Abb. 10) beschrieben. Da die Zytokine eine herausragende Rolle spielen, greifen neue Therapeutika z.B. TNF-Blocker, exakt an der

Zytokinschiene an. IL-17 wird als therapeutisches Ziel noch nicht angewandt, da dessen Rolle im Kontext des humanen Immunsystems noch nicht vollständig bekannt ist. Generell kann man sagen, dass das für die Rheumatoide Arthritis verantwortliche gesamte Zytokinnetzwerk und die daran beteiligten Faktoren noch nicht vollständig untersucht sind. Das Aufklären der Zusammenhänge und die funktionellen Hierarchien zwischen den Zytokinen können neue Möglichkeiten darstellen, die Krankheit zu kontrollieren, den Prozess zu stoppen oder sogar vollständig auszuheilen. Aus diesem Grund wurde der Fokus in dieser Arbeit, neben den NK-Zellen, auf die Analyse der löslichen synovialen Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren gelegt.

### 3.3 Entzündungsreaktion im Kniegelenk bei Rheumatoider Arthritis



**Abb. 10 Aufbau eines Kniegelenks und die Veränderungen bei Arthritis**

Die Abbildung zeigt den Aufbau eines Kniegelenks. Das Gelenk besteht aus einem knöchernen Gelenkkörper, welcher von Knorpel überzogen ist. Zwischen den Gelenkkörpern liegt der Gelenkspalt, der die Gelenkschmiere (Synovialflüssigkeit) enthält. Das Gelenk ist von einer Gelenkkapsel umgeben. Diese besteht aus einer äußeren, wenig elastischen Faserschicht und der dünnen, bindegewebigen Gelenkinnenhaut, dem Synovium (= synoviale Membran). Adaptiert nach Smolen et al. (Smolen and Steiner 2003). \* **Anmerkung:** in der Vielzahl an Veröffentlichungen über die Immunantwort bei Gelenkerkrankungen wurden die NK-Zellen bisher vernachlässigt und wurden in dieser Arbeit in das Bild der zellulären Zusammensetzung integriert.

Die synoviale Membran (Synovium) ähnelt funktionell den epithelialen Oberflächen anderer flüssigkeitsgefüllter Hohlräume wie beispielsweise Pleura, Peritoneum oder vaskulären Endothelien. Architektonisch unterscheidet sich die Synovialmembran jedoch deutlich von anderen Endothelien und Epithelien, da sie zum einen nicht aus einem einzigen spezialisierten

Zelltyp aufgebaut ist und zum anderen keine abgrenzende Basalmembran aufweist. Das Synovium enthält zwei unterschiedliche Zelltypen: synoviale Makrophagen und synoviale Fibroblasten, welche eine dünne Gewebsschicht bilden, die nur an die Knorpel-Knochengrenze heranreicht. Im Rahmen eines Entzündungsprozesses entsteht ein aktiviertes, hypertrophierendes Gewebe, das über den Gelenkknorpel hinaus wächst. Die synovialen Fibroblasten können den Knorpel infiltrieren und so zu dessen Zerstörung beitragen. Das gesamte Synovium verdickt sich, da Immunzellen aus dem peripheren Blut einwandern, wobei den größten Teil hierbei die Monozyten/ Makrophagen ausmachen (60 %). Es infiltrieren aber auch T- und B-Lymphozyten, Dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, Mastzellen und natürlich NK-Zellen in dieses Kompartiment (McInnes and Schett 2007). Die Lymphozyten sind meistens diffus im gesamten Synovium verteilt, sie können aber auch Lymphfollikel-ähnliche Strukturen (ektopische terziäre Lymphorgane), z.T. sogar mit Keimzentren, ausbilden (Wagner, Kurtin et al. 1998, Takemura, Braun et al. 2001), wobei hierbei im Mausmodell die Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 eine entscheidende Rolle spielen (Wengner, Hopken et al. 2007). Um die Versorgung an Sauerstoff und Nährstoffen aufrecht zu erhalten, findet im entzündeten Synovium eine zunehmende Gefäßbildung (Angiogenese) statt, welche sogar eine Voraussetzung für die synoviale Hyperproliferation darstellen kann, da die Inhibierung der Angiogenese die Entzündung des Synoviums *in vitro* und *in vivo* unterdrücken kann (Paleolog 2002, Veale and Fearon 2006). Außerdem können Lymphozyten in einem gut definierten Prozedere aus Adhäsion und Diapedese kontrolliert aus den neuen Gefäßen in das Gewebe einwandern. Das lokale Milieu aus Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren determiniert also auf verschiedenen Ebenen den komplizierten Prozess der Lympho- und Leukozyteninfiltration, wobei die Frage nach der „Henne und dem Ei“ noch nicht abschließend geklärt ist.

## 4 Psoriasis vulgaris

Die Psoriasis vulgaris stellt eine Autoimmunkrankheit dar, die sich hauptsächlich in der Haut, aber zum Teil auch als Psoriasis Arthritis an den Gelenken manifestiert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Dermatologischen Klinik der LMU (Prof. J. Prinz) anfangs mit peripherem Blut von Psoriasis-Patienten vorgenommen. Psoriasis vulgaris stellt eine der ersten Autoimmunkrankheiten dar, bei der eine Assoziation mit KIR- und HLA-C-Molekülen gezeigt werden konnte (Tiilikainen, Lassus et al. 1980, Luszczyk, Manczak et al. 2004). Aus diesem Grund sollte bei dieser Krankheit die Rolle der NK-Zellrezeptoren auf T-Zellen und der NK-Zellen selbst untersucht werden, wobei von Psoriasis-Patienten aber leider keine Hautproben zu Verfügung standen, so dass die Gewebeeinfiltration der NK-Zellen anhand dieses Patientenkollektivs nicht untersucht werden konnte. Da dies durch die Synovialflüssigkeitsproben bei Gelenkerkrankungen möglich war, lag der Fokus im weiteren Verlauf der Arbeit auf der Untersuchung dieser Proben. Die Psoriasis-Patienten stellten jedoch bei der Untersuchung peripherer NK-Zellen ein sehr gutes Kontrollkollektiv mit autoimmunem Kontext dar.

Bei Psoriasis vulgaris handelt es sich um eine durch T-Zellen vermittelte Autoimmunkrankheit. Sie betrifft 2-3 % der westlichen Bevölkerung und das Krankheitsbild äußert sich in einer ungehemmten, jedoch nicht malignen Hyperproliferation von Hautkeratinozyten. Hierbei spielen nach der derzeit anerkannten Hypothese der Autoimmunität vor allem Zytokine, die von DC-, T- und NK-Zellen produziert werden, eine sehr wichtige Rolle. Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen scheint auch bei Psoriasis-Patienten gehäuft eine genetische Prädisposition aufzutreten, nämlich das Vorhandensein bestimmter NK-Rezeptoren in Kombination mit bestimmten HLA-Molekülen. Bei Psoriasis liegt eine starke Assoziation mit *HLA-Cw6* vor (Tiilikainen, Lassus et al. 1980, Mallon, Bunce et al. 1997). Als genetische Assoziation scheinen auch die aktivierenden und inhibitorischen Killer-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR) eine wichtige Rolle zu spielen. So wurde eine genetische Prädisposition mit KIR2DS1 beschrieben (Luszczyk, Manczak et al. 2004) und es wurden KIR<sup>+</sup> T-Zellen bei Psoriasis-Patienten mit erhöhter Frequenz in der Haut und der Peripherie entdeckt (Liao, Jee et al. 2006). Bei Patienten mit Psoriasis Arthritis wurde außerdem eine genetische Prädisposition für KIR2DS2 und KIR2DS1 in Abwesenheit bestimmter HLA-C-Allele gezeigt (Martin, Nelson et al. 2002, Williams, Meenagh et al. 2005). Diese genetische Assoziation könnte wieder, wie in Abb. 9 beschrieben, zu einer verminderten Inhibierung der KIR<sup>+</sup> NK- oder T-Zellen führen.

## 5 Aufgabenstellung

Da die Rolle von NK-Zellen in autoimmunen Prozessen noch weitgehend ungeklärt ist, sollte diese im Rahmen der Autoimmunerkrankungen Rheumatoide Arthritis und Psoriasis vulgaris näher untersucht werden. Dabei stellte sich grundsätzlich die Frage, welche NK-Zell-Subpopulation sich am Ort der Entzündung im Gewebe befindet und welchen Phänotypen bzw. welche Funktion sie dort besitzt. Es sollten daher die peripheren NK-Zellen der Patienten mit den synovialen NK-Zellen bezüglich ihres Phänotyps und ihrer Funktion verglichen werden. Bislang existiert kein spezifischer NK-Zellmarker, der mit der Gewebeeinfiltration korreliert werden kann. Es ist aus der Literatur nur bekannt, dass „CD56<sup>bright</sup>“ NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten und in einigen anderen Geweben, darunter auch Lymphknoten und Tumorgewebe, dominieren. Aus diesem Grund sollte die Korrelation der NK-Zellinfiltration mit >25 verschiedenen Markern untersucht werden, um die molekulare Basis für diese präferenzielle Infiltration einer NK-Zellpopulation besser verstehen zu können. Zudem sollte die Funktion der synovialen und peripheren NK-Zellen miteinander verglichen werden, wobei im Mittelpunkt Zytokine und Chemokine standen, da sie bei der Regulation von autoimmunen Prozessen unerlässliche Stimulatoren sind. Während in allen Publikationen zu Arthritis und Arthrose einzelne Parameter wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  oder IL-6 analysiert wurden, sollte in dieser Arbeit erstmals eine umfassende Quantifizierung der 50 wichtigsten Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren durchgeführt werden. Aus dem mengenmäßig minimalen Material an Synovialflüssigkeit ist dies auf Proteinebene nur mittels Protein-Multiplex-Analysen möglich, die eine parallele Analyse von 50 verschiedenen Parametern in den Synovialflüssigkeiten und den Seren der Patienten ermöglicht. Es sollten so die Unterschiede zwischen den autoimmunen und nicht-autoimmunen Zytokinnetzwerken in der Synovialflüssigkeit eruiert, und die Leitzytokine für die verschiedenen Gruppen definiert werden. Des Weiteren sollte die Musterbildung aus den 50 Parametern dahingehend bestimmt werden, dass eine eindeutige Zuordnung unbekannter Proben anhand des definierten Musters möglich ist. Mit einer derartigen Musteranalyse sollte es in Zukunft möglich sein, den immunologischen Unterschied der Zytokinnetzwerke zu nutzen, um den Therapieverlauf zu beobachten und gegebenen Falls neue Ansätze zur indirekten Therapie bei Arthritis im Gegensatz zur Arthrose zu finden.

## C Material

### 1 Geräte

Tab. 2 Geräte

GERÄT	FIRMA
Bestrahlungsanlage Gammacell 40	Atomic Energy of Canada
Durchflusszytometer Luminex <sup>TM</sup>	Bio-Rad
Durchflusszytometer, FACSCalibur <sup>TM</sup>	Becton Dickinson
Durchflusszytometer, LSRII <sup>TM</sup>	Becton Dickinson
Eismaschine AF-30	Scotsman
Elektrophoresekammern EI19001	Novex-Invitrogen
Elektroporationssystem Gene Pulser Xcell <sup>TM</sup>	BioRad
Gefrierschrank, -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank, -80 °C	Heraeus
Geldokumentationssystem	Syngene
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Heizplatte mit Magnet	IKA-Labortechnik
Inkubationsschrank	Heraeus
Kühlschränke, 4 °C	Liebherr
Magnet	Dynal
Mehrkanalpipetten (25-200 µl)	Bibby Dunn Labortechnik
Mikropipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Gilson, Socorex
Mikroskop	Leica DMIL
Mikrowelle	SHARP
Millipore Wasser Anlage Milli-Q	Millipore
Neubauerzählkammer	Hecht-Assistent
pH-Meßgerät	WTW
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann
PCR Gerät	Whatman Biometra
Rollmischer	Coulter Electronics
Schüttler	Biotec-Fischer
Schüttelinkubator	Infors AG
Spannungsgerät LK3 GPS 200/400	Pharmacia
Spektralphotometer	Amersham Biosciences
Sterilwerkbank	BDK Luft- und Klimatechnik
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim
Stoppuhr	NeoLab
Vortexer VF2	IKA-Labortechnik
Analysewaage	Mettler PC440
Präzisionswaage	Mettler AE166
Ultrafiltrationssystem Typ A 8400	Millipore-Amicon
Wasserbad	GFL
Eppendor fzentrifuge	Heraeus
Kühlzentrifuge	Heraeus
TopCount NXT Topcounter	Packard

## 2 Chemikalien

Tab. 3 Chemikalien

CHEMIKALIE	FIRMA
Ammoniumchlorid	Sigma
Ampicillin	Sigma
Natrium-Azid	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma
Chloroform	Sigma
DEPC (Diethylpyrocarbonat) Wasser	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Invitrogen
Glucose	Merck
Glycerin 87 %	Merck
Ionomycin, Kalziumsalz	Sigma
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Invitrogen
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma
Kanamycin	Sigma
L-Lectin 100 $\mu$ g/ml	Sigma
Lysozym	Sigma
L-Gluthation oxidiert	Sigma
L-Gluthation reduziert	Sigma
Magnesiumchlorid	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
PBS (Phosphat-gepufferte Saline)	Invitrogen
<i>Tri Reagent</i>	MCR ( <i>Molecular Research Center</i> ), Inc.
Trypanblau 0,4 %	Invitrogen
Trypsin/EDTA	Sigma

## 3 Verbrauchsmaterial Molekularbiologie

### RNS Isolierung

Tri Reagent	Ethanol
Chloroform	DEPC Wasser
Isopropanol	

### Reverse Transkription

dNTP-Mix, 10 mM	Invitrogen
DTT, 0,1 M	Invitrogen
1 <sup>st</sup> strand buffer 5 x	Invitrogen
Oligo dT Primer 0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l	Invitrogen
Superscript II 200 U/ml	Invitrogen
DEPC Wasser	Sigma

## PRIMER

Tab. 4 Verwendete Primer

Spezifität	Sense Primer (5'-3')	Antisense Primer (5'-3')	Länge bp
<b>ULBP4syn</b>	ATCAAATTGGGTACCG GATCCATGCGG	TAATGGCGACCGGTGG AG ATGTCCTGAG	807
<b>ULBP4wt</b>	TATGTCGACCTCCACAG TATGCGAAGAATATCC CTG	ATAGGCGGCCGCAGAC TAAGACGTCCTCAA	810
<b>ULBP4syn <u>KpnI</u></b>	ATCAAATTGGGTACCG GATCCATGCGG		810
<b>ULBP4syn <u>AgeI</u></b>		TAATGGCGACCGGTGG AGATGTCCTGAGGGG	810
<b>β-Actin</b>	TGACGGGGTCACCAC ACTGTGCCCATCTA	CTAGAAGCATTTGCGG TGGACGATGGAGGG	662

## PCR Reagenzien

dNTP 10 mM aus dATP, dTTP, dGTP, dCTP je 2,5 mM	Invitrogen
10 x PCR Puffer, Minus Mg <sup>++</sup>	Invitrogen
Taq DNS Polymerase 5 U/μl	Invitrogen
50 mM Magnesiumchlorid	Invitrogen
Wasser bidest	Invitrogen

## Gelelektrophorese

TAE-Puffer 50 x	Invitrogen
Agarose SeaKem	BMA Biozym
1 kb Plus DNA Leiter	Invitrogen
Bromphenolblau	Invitrogen

## DNS Isolierung aus Gel

QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen
----------------------------	--------

## Enzyme für Klonierung

Taq DNA-Polymerase 5000 U/ml	Pharmacia
T4 DNA-Ligase 1 U/μl	Roche
Kpn I 10 U/μl	Fermentas
Age I (BshTI) 10 U/μl	Fermentas
Alkalische Phosphatase 1 U/μl	Roche

## Medien und Puffer für Klonierung

S.O.C. Medium	Invitrogen
LB (Luria-Bertani)-Medium	Sigma
Restriktionspuffer KpnI 10 x	Fermentas
Restriktionspuffer AgeI 10 x	Fermentas
Alkalische Phosphatase Puffer 10 x	Roche
T4 DNA-Ligase Puffer 10 x	Roche



**Sonstiges**

dATP 100 mM	Invitrogen
Ampicillin 100 mg/ml	Sigma
Kanamycin 50 mg/ml	Sigma
Agar	Sigma
Petrischalen	Greiner
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
JetStar Maxiprep Kit	Genomed
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen

**Bakterien**

DH5 $\alpha$ -T1 Bakterien	Invitrogen
----------------------------	------------

**Vektoren (Vektorkarten Abb. 52, Anhang)**

pcDNA3.1	Invitrogen
pAcGFP1-N1	Clontech
pPCR-Script-ULBP4syn	Geneart

**4 Verbrauchsmaterial Zellkultur****Plastik/Glasware**

Einfrierröhrchen	Nunc
Glaspipetten	Hirschmann
Lumaplatten	PerkinElmer
Magnet für Zellseparation	Dynal
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 17 cm <sup>2</sup> )	Falcon
Zellkulturplatten (6-Loch, 24-Loch)	Falcon
Zellkulturplatten (96-Loch, Rundboden)	Falcon

**Lösungen, Verbrauchsmedien und Zusätze****Erylyse Puffer (10x):**

155mM Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Labor C.S Falk
100mM Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	
1mM EDTA	
Wasser, pH= 7,3	
Vor Gebrauch verdünnen und sterilfiltrieren	

**FACS-Puffer:**

0,1 % NaN <sub>3</sub>	Labor C.S Falk
5 % FBS	
PBS	

Ficoll, Biocoll Separationslösung	Biochrom AG
FBS (Fötales Kälberserum)	Invitrogen
Geneticin (G418-Sulfat), 100 mg/ml	Pan Biotech GmbH
Heparin	Braun
Humanserum	Labor C.S. Falk
Hygromycin B, 50 mg/ml	Invitrogen
IL-2, rekombinant, human (Proleukin)	Ceutus

IL-15	PromoCell
L-Glutamin, 200 mM	Invitrogen
MEM (Nicht-essentielle Aminosäuren) 100 x	Invitrogen
Natriumpyruvat, 100 mM	Invitrogen
Optimem Medium	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin 100 U/ml	Invitrogen
RPMI 1640	Invitrogen
Trypanblaulösung (0,4 % in physiolog. Saline)	Invitrogen
Trypsin/EDTA-Lösung (10 x in PBS lösen)	Invitrogen

Tab. 5 Verwendete Medien

MEDIEN	
<b>RPMI III Medium</b>	RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat
<b>Tumormedium (TM)</b>	RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 1 x MEM 10 % FBS
<b>Selektionsmedium</b>	0,4 mg/ml G418 in C1R-Medium (C1R-pcDNA3.1, C1R-ULBP4, C1R-AcGFP, C1R-AcGFP-ULBP4)
<b>C1R Medium</b>	RPMI III 7 % FBS
<b>CML Medium</b>	RPMI III 15 % FBS
<b>Einfriermedium</b>	RPMI III 20 % DMSO 50 % FBS

## 5 Verbrauchsmaterial Allgemein

FACS-Röhrchen	Greiner
Handschuhe	Kimberly-Clark
Einmalküvetten	NeoLab
Einwegpipetten	Falcon; Greiner
Gene Pulser Küvette 0,4 cm	BioRad
Glasware (Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Meß-	Schott Duran
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Greiner; Starlab
Pipettenspitzen, gestopft (10, 200, 1000 µl)	Starlab
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Sarsted
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner, Eppendorff
Rührfische	NeoLab
Skalpelle	Braun
Spritzen, Kanülen	BD; Braun

## 6 Zelllinien

Tab. 6 Verwendete Zelllinien

ZELLINIE	BESCHREIBUNG	MEDIUM	HERKUNFT
C1R	EBV-immortalisierte B Zell-Linie	C1R	D. Schendel
C1R-pcDNA3.1	C1R transfiziert mit pcDNA3.1 Plasmid	SM	C. Falk
C1R-ULBP4	C1R transfiziert mit pcDNA3.1-ULBP4	SM	C. Falk
C1R-AcGFP	C1R transfiziert mit pAcGFP-N1 Plasmid	SM	C. Falk
C1R-ULBP4	C1R transfiziert mit pAcGFP-ULBP4 Plasmid	SM	C. Falk
Daudi	Burkitt B-Zell-Lymphom, homozygoter $\beta_2m$ -Gendefekt	TM	ATCC
K-562	Erythroleukämiezelllinie, MHC-Klasse-I-negativ	TM	ATCC
L721.221	EBV-transformierte B Zelllinie, HLA-Klasse I negativ	TM	D. Schendel
NKL	NK-Leukämiezelllinie	NKL	M. Lopez-Botet
HaCat	humane Keratinozyten Zelllinie	TM	E. Weiß
HeLa	Zervixkarzinom-Zelllinie	TM	D. Schendel
MelJuso	humane Melanomzelllinie	TM	J. Johnson

## 7 Blut- und Synovialflüssigkeitsproben

### 7.1 Arthritis-Patienten

**SF** Synovialflüssigkeit  
**RA** Rheumatoide Arthritis  
**ReA** Reaktive Arthritis

**OA** Oligoarthritis  
**PA** Polyarthritis  
**?** unklare oder unbekannte Diagnose

Tab. 7 Arthritis-Patienten: Synovialflüssigkeit und Blut

PAT#	GESCHLECHT	SF	BLUT	DIAGNOSE
SYN#01	M	x	x	ReA
SYN#02	?	x		?
SYN#03	W	x	x	RA
SYN#04	W	x		Undifferenzierte OA (ReA?)
SYN#05	W	x		RA
SYN#06	W	x		Undifferenzierte OA (RA?, ReA?)
SYN#07	?	x		?
SYN#08	W	x	x	RA
SYN#09	W	x		RA
SYN#10	M	x	x	Lyme Arthritis
SYN#11	W	x	x	RA
SYN#12	W	x	x	RA
SYN#13	M	x	x	RA
SYN#14	W	x	x	RA
SYN#15	W	x		ReA
SYN#16	W	x		Undifferenzierte PA
SYN#17	M	x	x	Undifferenzierte OA
SYN#18	M	x		Arthritis urica (Gicht)
SYN#19	W	x	x	Aktivierte Arthrose
SYN#20	M	x	x	RA
SYN#21	M	x		?
SYN#22	W	x	x	RA
SYN#23	W	x	x	Undifferenzierte PA
SYN#24	W	x	x	RA
SYN#25	W	x	x	?
SYN#26	M	x		?

## 7.2 Arthrose-Patienten

Tab. 8 Arthrose-Patienten: Synovialflüssigkeit und Blut

PAT#	GESCHLECHT	SF	BLUT	DIAGNOSE
TEP 40	W	x	x	Gonarthrose
TEP 41	W	x	x	Gonarthrose
TEP 23	M	x	x	Gonarthrose
TEP 24	M	x	x	Gonarthrose
TEP RJ	M	x	x	Gonarthrose
TEP AS	W	x	x	Gonarthrose
TEP MB	W	x	x	Gonarthrose
TEP MS	W	x	x	Gonarthrose

Für die Zytokinmessung lagen 18 Serum- und 23 Synovialflüssigkeitsproben von weiteren Arthrose-Patienten vor.

## 7.3 Psoriasis-Patienten

Tab. 9 Psoriasis-Patienten: Serum und Blut

PAT#	GESCHLECHT	SERUM	BLUT	PAT#	GESCHLECHT	SERUM	BLUT
PSO#30	M	x	x	PSO#44	M	x	x
PSO#31	W	x	x	PSO#45	M	x	x
PSO#32	M	x	x	PSO#46	M	x	x
PSO#33	W	x	x	PSO#47	M	x	x
PSO#34	M	x	x	PSO#48	M	x	x
PSO#35	M	x	x	PSO#49	W	x	x
PSO#36	M	x	x	PSO#50	M	x	x
PSO#37	M	x	x	PSO#51	M	x	x
PSO#38	M	x	x	PSO#52	M	x	x
PSO#39	M	x	x	PSO#53	W	x	x
PSO#40	W	x	x	PSO#54	M	x	x
PSO#41	M	x	x	PSO#55	M	x	x
PSO#42	M	x	x	PSO#56	M	x	x
PSO#43	W	x	x	PSO#57	M	x	x

## 7.4 Normalspender

Tab. 10 Normalspender: Serum und Blut

NS#	GESCHLECHT	SERUM	BLUT	NS#	GESCHLECHT	SERUM	BLUT
TR	M	x	x	HaB	M	x	x
PR	M	x	x	CF	W		x
DtM	M		x	MS	M	x	x
GA	M	x	x	BF	M	x	x
WG	M	x	x	AM	M	x	x
KK	M	x	x	JB	W	x	x
MH	M	x	x	TA	M	x	x
MA	M	x	x	FA	M	x	x

## 8 Antikörper

### 8.1 Primärantikörper

Tab. 11 Primärantikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Synonym	Konjugation	Hersteller
Isotypkontrolle	MOPC21	IgG1		-	Sigma
Isotypkontrolle	UPC10	IgG2a		-	Sigma
Isotypkontrolle	7T4-1F5	IgG2a		PE	Beckman/Coulter
Isotypkontrolle	MOPC19	IgG2b		FITC	BD
Isotypkontrolle	7T4-1F5	IgG2a		PE	Beckman/Coulter
Isotypkontrolle	X39	IgG2a		PerCP	BD
Isotypkontrolle	X39	IgG2a		APC	BD
HLA-Klasse I	W6/32	IgG2a		-	J. Johnson
CD3	UCHT1	IgG1		FITC	Beckman/Coulter
CD4	13B8.2	IgG1		APC	J. Mysliwicz
CD6	M-T605	IgG1		PE	BD
CD8	B9.11	IgG1		PE	Beckman/Coulter
CD14	M5E2	IgG1		FITC	BD
CD16	3G8	IgG1		FITC	Beckman/Coulter
CD19	J4.119	IgG1		FITC	Beckman/Coulter
CD25	B1.49.9	IgG2a	IL-2R $\alpha$	FITC	Beckman/Coulter
CD44	37.51.1	IgG1		FITC	Beckman/Coulter
CD45RA	ALB11	IgG1		FITC	Beckman/Coulter
CD45RO	UCHL1	IgG2a		PE	Beckman/Coulter
CD56	NKH-1	IgG1		APC	Beckman/Coulter
CD56	NKH1	IgG1		APC-Alexa 700	Beckman/Coulter
CD56	NKH-1	IgG1		PE	Beckman/Coulter
CD69	TP1.55.3	IgG2b		PE	Beckman/Coulter
CD85j	HP-F1	IgG1	ILT2, LIR-1	PE	Beckman/Coulter
CD94	HP3D9	IgG1		FITC	BD
CD94	HP3B1	IgG2a		PE	Beckman/Coulter
CD107a	H4A3	IgG1		FITC	BD
CD107a	H4A3	IgG1		PE	BD
CD158a	EB6	IgG1	2DL/S1; p58.1	PE	Beckman/Coulter
CD158b	GL183	IgG1	2DL/S2,3; p58.2	PE	Beckman/Coulter
CD158e1	Z27.3.7	IgG1	3DL1;p70; NKB1	PE	Beckman/Coulter
CD158i	FES172	IgG2a	2DS4;p50.3	PE	Beckman/Coulter
CD159	Z177	IgG2b	NKG2A	PE	Beckman/Coulter
CD161	191B8	IgG2a	NKRP-1A	PE	Beckman/Coulter
CD244	C1.7	IgG1	2B4	PC5	Beckman/Coulter
LAIR-1	DX26	IgG1		PE	BD
NKG2C	134591	IgG1		APC	R&D
NKG2D	149810	IgG1		PE	R&D
Nkp30	Z25	IgG1		PE	Beckman/Coulter
Nkp44	Z231	IgG1		PE	Beckman/Coulter
Nkp46	BAB281	IgG1		PE	Beckman/Coulter

ULBP1	170818	IgG2a	R&D
ULBP2	165903	IgG2a	R&D
ULBP3	JFY02	IgG2a	R&D
ULBP4	7H7	IgG2a	E. Kremmer
ULBP4	7H2	IgG2a	E. Kremmer
MIC A	159227	IgG2b	R&D
MIC B	236511	IgG2b	R&D

## 8.2 Sekundärantikörper

Tab. 12 Sekundärantikörper

Spezifität	Organismus	Konjugation	Hersteller
$\alpha$ Maus	Ziege	PE	Jackson ImmunoResearch
$\alpha$ Ratte	Ziege	PE	Jackson ImmunoResearch

## 9 Multiplex Analysen mittels Luminex-Technologie

Reagenzien Kit A	Bio-Rad
Humanes 23-Plex Zytokin-Repertoire (IL-1 $\alpha$ , IL-2R $\alpha$ , IL-3, IL-12(p40), IL-16, IL-18, CTACK, GRO- $\alpha$ , HGF, ICAM-1, IFN- $\alpha$ 2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, $\beta$ -NGF, SCF, SCGF- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TRAIL, VCAM-1)	Bio-Rad
Humanes 27-Plex Zytokin-Repertoire (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, basic-FGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-bb, RANTES, TNF- $\alpha$ , VEGF)	BioRad
Serum Diluent Human	Millipore
96-Loch- <i>Multiscreen</i> -Platten	One Lambda
LabType® SSO C Locus Typing Test	One Lambda
LabType® SSO KIR Typing Test	Bio-Rad
Bio-Plex Kalibrierungskit	NeoLab
PCR 96-Loch-Platten	Greiner
96-Loch-Gewebekulturplatte V-Form	Qiagen
LiquiChip™ Control Bead Kit	Qiagen
LiquiChip™ Calibration Bead Kit	

## 10 Kooperationspartner

Dr. Elisabeth Kremmer, Institut für Molekulare Immunologie, HZM, München  
 Dr. Matthias Witt und Dr. Rudolf Gruber, Rheumatologie, Klinikum LMU München  
 Prof. Dr. Jörg Prinz, Dermatologie, LMU München  
 Prof. Dr. Gunther O. Hofmann, Traumatologie Uniklinikum Jena und BG Klinik Halle

## 11 Firmenverzeichnis

Agfa-Gevaert, Leverkusen	IKA Labortechnik, Staufen
Amersham, Little Chalfont, England	Immunotech, Minnesota, USA
ATCC, Rockville, Maryland, USA	Invitrogen/Life Technologies, Karlsruhe
Atomic Energy of Canada, Ontario, Kanada	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Avidity, Denver, USA	Julabo, Seelbach
BDK Luft- u. Reinraumtechnik, Sonnenbühl	Kodak, Stuttgart
Bibby Dunn Labortechnik, Asbach	Leica, Wetzlar
Beckmann Coulter/Immunotech, USA	Liebherr, Biberach an der Riss
Becton Dickinson Biosciences (BD), USA	Merck, Darmstadt
Biochrom, Berlin	Messer Griesheim, Krefeld
Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA	Mettler, Gießen
Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen	Millipore, Badford, Massachusetts, USA
Biozym, Hess, Oldendorf	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
BMT, Meerbusch-Osterath	Nalgene, Rochester, New York, USA
Brand, Wertheim	NeoLab, Heidelberg
Branson Ultrasonics, Danbury, USA	Novagen, Wisconsin, USA
Braun, Melsungen	Nunc, Naperville, USA
Corning, New York, USA	One Lambda, siehe BMT
DAKO, Glostrup, Dänemark	PAN Biotech, Aidenbach
Dianova, Hamburg	PerkinElmer, Massachusetts, USA
Difco Laboratories, Detroit, Michigan,	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Dynal, Oslo, Norwegen	PromoCell, Heidelberg
Eppendorf, Hamburg	Qiagen, Chatsworth, Kalifornien, USA
Falcon, Oxnard, Kalifornien, USA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Invitrogen, Gaithersburg, Maryland, USA	Roche, Mannheim
Geneart AG, Regensburg	Sartorius, Göttingen
Genomed, Löhne	Scotsman, Vernon Hills, Illinois, USA
GFL Gesellschaft für Labortechnik, Großburgwedel	Sharp Electronics Corporation, Mahwa, New Jersey, USA
Greiner, Nürtingen	Serotec, Oxford, UK
Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Hecht-Assistent, Sondheim-Rhön	Starlab, Ahrensburg
Heraeus, Hanau	Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA
Hirschman, Unterhaching	VWR International GMBH, Darmstadt
Hybaid, Teddington, UK	Whatman Biometra, Göttingen
IBA GmbH, Göttingen	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim



## D Methoden

### 1 Methoden der Molekularbiologie

#### 1.1 RNS-Isolierung

Für die Isolierung von mRNS wurden zwischen  $1 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  Zellen verwendet. Das Zellpellet wurde mit 0,2 ml Tri Reagent pro  $1 \times 10^6$  Zellen gemischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurden 40 µl Chloroform pro 200 µl Tri Reagent zugefügt, 15 Sekunden gevortext und anschließend bei Raumtemperatur 2-15 Minuten inkubiert. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C bildete sich oben eine farblose, wässrige Phase, in der sich die RNS befindet. Diese Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 100 µl Isopropanol pro 200 µl Tri Reagent zur Fällung der RNS durch Vortexen vermischt und anschließend 5-10 Minuten bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 4 °C und 12000 g wurde die RNS als weißliches Pellet sichtbar. Der Überstand wurde verworfen und die RNS wurde mit 500 µl 75%igen Ethanol in DEPC-Wasser und durch Zentrifugation für 8 Minuten bei 4 °C und 12000 g gewaschen. Nach Abnehmen des Überstands wurde das RNS-Sediment 3 Minuten luftgetrocknet und in 20 µl DEPC Wasser resuspendiert. Der Gehalt an RNS wurde mit einer 1:100 Verdünnung bei einer OD (optische Dichte) von 260 nm am Spektrometer gemessen. Hierfür sollte die OD 260/280-Ratio bei einer Verdünnung in DEPC-Wasser zwischen 1,6 und 1,9 liegen. Die RNS wurde bei -20 °C aufbewahrt.

#### 1.2 Reverse Transkription

Die isolierte RNS wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden 1-5 µg der mRNS mit 0,5 µg/µl Oligo-dT Primern ad 12 µl DEPC Wasser für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und sofort auf Eis überführt. Die Oligo-dT Primer binden an die polyA-Reste der mRNS. Nach Zugabe von 8 µl Reaktionsgemisch aus 1x *first strand buffer*, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTP und 200 U der reversen Transkriptase Superscript II, wurde der 20 µl-Gesamtansatz in einem PCR-Gerät für 70 Minuten bei 42 °C inkubiert. Hierbei wurde die mRNS in cDNS umgeschrieben. In einem weiteren Inkubationsschritt von 5 Minuten bei 90°C wurde das Enzym deaktiviert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 1.3 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Durch die PCR konnten spezifische Sequenzen genomischer DNS oder der cDNS amplifiziert werden. Um zu testen, ob diese Sequenzen in der DNS enthalten sind, wurde die Reaktion mit spezifischen Primern für die entsprechenden Gene durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde immer  $\beta$ -Actin amplifiziert. Hierbei handelt es sich um ein sogenanntes „Haushaltsgen“, das immer von jeder Zelle exprimiert wird. Als Negativkontrolle wurde in einem Ansatz die DNS durch Wasser ersetzt.

Die folgende Tabelle zeigt die typische Zusammensetzung einer PCR Reaktion und die Endkonzentrationen der verschiedenen Reagenzien:

Eingesetzte Menge	Endkonzentration	Komponente	Stammlösung
variabel	5-15 ng	DNS	variabel
2 $\mu$ l	1x	PCR Puffer	10 x
0.6 $\mu$ l	1.5 mM	Magnesiumchlorid	50 mM
2 $\mu$ l	1 mM	dNTPs	10 mM
variabel	15 pMol	Primer sense	variabel
variabel	15 pMol	Primer antisense	variabel
0.2 $\mu$ l	1U	<i>Taq</i> Polymerase	5 U/ $\mu$ l
ad 20 $\mu$ l		Wasser	

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	5 Minuten	94 °C	1
Amplifikation	30 Sekunden	94 °C	30-37
	45 Sekunden	60-62°C	
	1 Minute	72 °C	
Endpolymerisation	10 Minuten	72 °C	1
Stopp		4 °C	

Nach der Amplifikation wurden die Proben zur Überprüfung der PCR auf ein Agarosegel aufgetragen.

### 1.4 Gelelektrophorese

Die Amplifikate wurden über ein 1,5%-iges Agarosegel aufgetrennt. Dafür wurden 1.5g Agarose in 100 ml 1x TAE Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, nach dem Abkühlen wurden 6  $\mu$ l 1%ige Ethidiumbromidlösung zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren und emittiert unter UV-Bestrahlung sichtbares Licht. Nach dem Gießen und der Polymerisation des Gels wurde es in eine mit Laufpuffer (1 x TAE

Puffer) gefüllte Kammer gelegt und die Proben aufgetragen. Hierfür wurden 5 µl der Probe sowie der Längenstandard mit Wasser und Auftragspuffer (1x) gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt, wobei die negativ geladene DNS in Richtung des positiven Pols lief. Nach Auftrennung der Proben wurde das Gel unter UV-Licht mit einer Digitalkamera fotografiert und dokumentiert.

### **1.5 Isolierung von DNS aus Agarosegel**

Zur Isolierung bestimmter DNS-Fragmente aus dem Agarosegel wurde der QIAquick Gelextraktionskit von Qiagen verwendet. Die Fragmente wurden auf einem UV-Schirm aus dem Gel ausgeschnitten und in einem Qiagen-Reaktionsgefäß aufgereinigt. Hierbei bindet die DNS an eine Siliziumgel-Membran in den Reaktionsgefäßen. Die zugehörigen Puffer besitzen bestimmte Salzkonzentrationen und pH-Werte, die das Binden und Eluieren der DNS ermöglichen. Die Bindung erfolgte hierbei bei einer hohen Konzentration an chaotrophischen Salzen, welche die Wasserstruktur modifizieren. Der Puffer QG löst die Agarose und schafft die Bedingungen für die Bindung der DNS an die Membran. Puffer PE wäscht die Salze, Primer, Ethidiumbromid, Enzyme und Detergenzien heraus und mit dem Puffer EB oder Wasser kann die DNS anschließend eluiert werden. Das Kit eignet sich für Konstrukte mit einer Größe von 70 bp bis 10 kb. Die Aufarbeitung wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### **1.6 Klonierung von ULBP4syn in den pAcGFP1-N1-Vektor**

Um die bekanntermaßen niedrige ULBP4-Expression gegebenenfalls zu verstärken, bzw. endogenes ULBP4 von synthetischem unterscheiden zu können, wurde für die Klonierung von ULBP4 in den pAcGFP1-N1-Vektor eine synthetische ULBP4-Sequenz mit angepasster „Codon Usage“ in einem pPCR-Script Vektor von der Firma Geneart AG bezogen. Das synthetische Gen besitzt, trotz einer abweichenden DNS-Sequenz, die gleiche Aminosäuresequenz wie das Wildtyp-Gen, und wird aber stabiler exprimiert. Die vollständigen ULBP4-Sequenzen sind unter Abb. 50 (Anhang, S.148) gezeigt. Das synthetische ULBP4 Gen wurde aus dem PCR-Script-ULBP4 Vektor (Geneart) amplifiziert und über die Schnittstellen der AgeI und KpnI Restriktionsenzyme in den pAcGFP1-N1-Vektor kloniert. Das ULBP4 Gen wird so mit seiner intrazytoplasmatischen Domäne mit dem N-Terminus des AcGFP Gen fusioniert. Das ULBP4-Gen wurde mittels PCR aus dem pPCR-Script Vektor amplifiziert. Hierfür wurden die Primer ULBP4syn KpnI (sense) und ULBP4syn AgeI (antisense) mit integrierten Restriktionsenzymchnittstellen verwendet

(siehe Tab. 4, Material S.28). Um die amplifizierte DNS-Sequenz in den Vektor klonieren zu können, müssen anschließend das PCR Produkt und der Vektor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten werden.

### Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation

Für den Restriktionsverdau wurden das gesamte PCR-Produkt bzw. 2 µg Vektor verwendet.

Eingesetzte Menge	Endkonzentration	Komponente	Stammlösung
variabel bzw. 2 µg		PCR-Produkt bzw.	
10 µl	1 x	Vektor	
3 µl	30 U	Restriktionspuffer	10 x
2 µl	30 U	AgeI	10 U/µl
ad 100 µl		KpnI	10 U/µl
		Wasser	

Der Ansatz wurde für 3 Stunden bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Laut Hersteller ist dieser Restriktionsverdau mit KpnI Restriktionspuffer durchführbar, obwohl das Enzym AgeI damit eine geringere Reaktivität zeigt. Um einen unregelmäßigen Verdau zu verhindern, wurde das Enzym KpnI erst nach ca. 1,5 Stunden zum Ansatz gegeben. Damit es bei der Ligationreaktion nicht zu einer unerwünschten Religation des Vektors kommt, wurden die 5'-Phosphatgruppen des restriktionsverdauten Vektors durch Dephosphorylierung entfernt.

Eingesetzte Menge	Endkonzentration	Komponente	Stammlösung
100 µl		Restriktionsverdau	
11 µl	1 x	alkalische Phosphatase-Puffer	10 x
1 µl	0.01 U	alkalische Phosphatase	1 U/µl

Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C im Heizblock inkubiert.

Der restriktionsverdaute Vektor und das PCR-Produkt wurden über Gelelektrophorese und anschließender DNS-Gelextraktion aufgereinigt. Die DNS-Konzentration wurde durch eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt.

Die Mengen des zu ligierenden DNS-Fragments und des Vektors hängen von deren Länge ab und müssen individuell bestimmt werden.

Eingesetzte Menge	Endkonzentration	Komponente	Stammlösung
100 ng		Vektor	variabel
variabel		DNS-Fragment	variabel
1,5 µl	1 x	T4 DNS-Ligase Puffer	10 x
1 µl	0,6 U/µl	T4 DNS-Ligase	1 U/µl
ad 15 µl		Wasser	

Der Ligationsansatz wurde für 1 Stunde bei 22 °C inkubiert und danach die Ligase für 20 Minuten bei 65 °C inaktiviert. Zusätzlich wurden zwei Kontrollen angefertigt. Kontrollansatz I enthält zur Überprüfung der Dephosphorylierungsreaktion kein DNS-Fragment, aber Ligase. Kontrollansatz II enthält weder DNS-Fragment noch Ligase, um den Restriktionsverdau des Vektors zu testen.

## 1.7 Expression in Bakterien

Für das Ausplattieren der transformierten Bakterien wurden Agar-Platten gegossen, wobei 10g LB in 500 ml destilliertes Wasser in einem Erlenmeyerkolben gelöst und 7,5 g Agar zugegeben wurden. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 50 °C wurde die Lösung mit Ampicillin (0,1 mg/ml) bzw. Kanamycin (0,1 mg/ml) versetzt. Danach wurden Petrischalen mit jeweils 25 ml des noch flüssigen Agars befüllt und zum Aushärten unter der Sterilbank stehengelassen. Bei der Transformation wurden der gesamte Ligationsansatz und die Kontrollansätze mit kompetenten DH5 $\alpha$ -T1 Bakterien für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 30 Sekunden bei 42 °C erwärmt, 2 Minuten auf Eis gegeben und anschließend in 250  $\mu$ l S.O.C. Medium aufgenommen. Dieser Ansatz wurde 1,5 Stunden bei 37 °C geschüttelt und daraufhin auf den Ampicillin- bzw. Kanamycin-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Klone gepickt, auf eine Replikaplatte überführt und durch eine sogenannte „Kolonie-PCR“ getestet. Hierfür wurde ein PCR-Ansatz (siehe 1.3) hergestellt, anstatt DNS wurden jedoch ganze Bakterien hinzugegeben. Durch die PCR mit den ULBP4 Primern BS1 ULBP4syn KpnI und BS2 ULBP4syn AgeI (siehe Tab. 4, S.28) wurde die Insertion des DNS-Fragments bestätigt. Die Replikaplaten wurden bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden dann die entsprechenden Klone gepickt und in 2ml LB-Medium, welches wiederum Ampicillin bzw. Kanamycin enthielt (0,1mg/ml), überimpft. Diese Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert und für eine DNS Minipräparation der Plasmide verwendet.

## 1.8 Plasmid-Aufreinigung aus Bakterien

### Mini- bzw. Maxipräparation

Die Mini- und Maxipräparation basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und anschließender Adsorption der DNS an eine Silizium-Membran in Anwesenheit einer hohen Konzentration von Salzen. Die Minipräparation erfolgte durch die Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) und die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben. Es

wurden 2 ml Übernacht-Bakterienkultur verwendet. Nach der Präparation wurde die Plasmid-DNS durch einen Restriktionsverdau mit entsprechenden Enzymen erneut überprüft. Die Maxi-Präparation dient zur Herstellung größerer Mengen Plasmid-DNS. Die Klone werden dazu in 400 ml LB-Ampicillin bzw. LB-Kanamycin-Medium (0,1 mg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen. Für die Präparation wurde das JetStar-Reagenziensystem verwendet. Es basiert auf Adsorptionssäulen aus Kieselerdepartikeln, die kovalent mit einer hydrophoben Substanz beschichtet sind. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Menge der gewonnenen DNS wurde durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (1 OD bei 260 nm entspricht 50 µg DNS/ml). Die Plasmid-DNS wurde von der Firma Sequiserve in ihrer Sequenz bestätigt und konnte dann für die Transfektion von Zelllinien verwendet werden (siehe 2.6).

## **2 Methoden der Zellkultur**

Alle Schritte der Zellkultivierung wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Medien, Lösungen und Materialien an einer Sterilwerkbank durchgeführt, um so eine Kontamination mit Pilzen und Bakterien zu vermeiden. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **2.1 Isolierung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC)**

#### **Ficoll-Separation**

Durch die Ficoll-Separation wurden mononukleäre Zellen aus dem venösen peripheren Blut isoliert. Die Abnehmeröhrchen wurden vor Blutentnahme zur Gerinnungshemmung mit 0,1 ml Heparin pro 10 ml Blut versetzt. Nach der Abnahme wurde das Blut im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und langsam auf 15 ml Ficoll in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 25 Minuten bei 840 g ohne Bremse. Die Dichte des Ficoll (1,077g/ml) erlaubt eine Auftrennung der Blutbestandteile gemäß ihrer spezifischen Dichte. Ficoll besitzt eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten und eine geringere Dichte als Erythrozyten und den meisten Granulozyten. Aus diesem Grund setzt sich nach der Zentrifugation die oberste Schicht aus dem Blutplasma und den Thrombozyten zusammen und die mittlere aus Lymphozyten und Monozyten (milchiger Ring, Interphase), welche direkt auf dem Ficoll liegt. Unter dem Ficoll befinden sich die Erythrozyten und die restlichen Granulozyten. Die Interphase wurde in ein frisches Röhrchen überführt und zweimal mit dem fünffachen Volumen PBS gewaschen. Hierfür erfolgte eine Zentrifugation

für 10 Minuten bei 540 g mit Bremse. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment durch Aufschütteln resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen (Lymphozyten und Monozyten) in RPMI III aufgenommen und gezählt.

### **Hypotone Lyse der Erythrozyten**

Durch eine hypotone Lyse wurden alle Leukozyten aus dem venösen, mit Heparin versetztem Blut der Patienten isoliert. Bei der hypotonen Lyse werden durch eine Salzlösung nur Erythrozyten zerstört. Hierfür wird die Blutprobe mit 5 Teilen Erylyse-Puffer (1 x) versetzt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit 20 ml PBS gewaschen und für 8 Minuten bei 472g zentrifugiert. Der Überstand (Lysat der Erythrozyten) wurde abgesaugt und der Lyse-Schritt ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in RPMI Medium aufgenommen und gezählt.

## **2.2 Isolierung der mononukleären Zellen aus Synovialflüssigkeit (SFMC)**

Da in der Synovialflüssigkeit weder Erythrozyten noch Thrombozyten enthalten sind, erübrigt sich der Ficoll-Schritt bzw. die Lyse der Erythrozyten. Dieser Schritt musste nur durchgeführt werden, wenn es bei der Entnahme der Synovialflüssigkeit zu einer Einblutung gekommen war. Um die mononukleären Zellen und die Granulozyten aus der Synovialflüssigkeit der Patienten zu isolieren wurden die Proben abzentrifugiert und die sedimentierten Zellen anschließend in 10 ml PBS aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde noch einmal mit PBS gewaschen. Falls sich Zellklumpen gebildet hatten, wurden die Zellen durch eine sterile Gaze filtriert. Anschließend wurden die Zellen gezählt.

## **2.3 Bestimmung der Zellzahl**

Aus einer Zellsuspension wurden 50 µl steril entnommen, 1:1 mit Trypanblau gemischt und davon 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und am Lichtmikroskop ausgezählt. Gezählt wurden nur die lebenden, d.h. nicht mit Trypanblau gefärbten Zellen. Da sich oftmals noch Erythrozyten in der Suspension befanden, wurde darauf geachtet nicht die abgeplatteten sondern nur die runden, kernhaltigen Zellen zu zählen. Die Zellen wurden in einem Großquadrat (16 Kleinquadrate) ausgezählt. Die Zellzahl pro ml Suspension ergibt sich aus der Formel: mittlere Zahl pro Großquadrat x Verdünnungsfaktor x  $10^4$ .

## 2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dafür musste beim Einfrieren DMSO zugesetzt werden, das die Bildung von Eiskristallen verhindert, welche die Zellen zum Platzen bringen würden. Da DMSO auf stoffwechselaktive Zellen toxisch wirkt, wurden alle Arbeitsschritte zügig und mit gekühlten Medien sowie vorgekühlten Einfriereröhrchen durchgeführt. Die abzentrifugierte Zellsuspension wurden in 0,5 ml kaltem FBS resuspendiert und das gleiche Volumen an 20 % DMSO in RPMI III zugegeben (pro Ampulle,  $5-10 \times 10^6$  Zellen). Die Röhrchen wurden zum Transport in eine Einfrierbox überführt, anschließend in Zellstoff verpackt (dies sorgt für eine langsame und schonende Absenkung der Temperatur) und mehrere Tage bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für die endgültige Aufbewahrung wurden die Zellen in der Gasphase über flüssigem Stickstoff ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in einem Stickstofftank eingelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden die gefrorenen Ampullen in einem  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad unter leichtem Schwenken angetaut. Die noch nicht vollständig aufgetauten Zellsuspensionen wurden in je 1 ml RPMI III und 1 ml FBS aufgenommen und 5 Minuten bei 540 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend mit 5 ml RPMI III gewaschen, erneut 8 Minuten bei 540 g abzentrifugiert und im jeweiligen Zellkulturmedium aufgenommen.

## 2.5 Kultivierung von Zellen

### Kultivierung adhärenter Zellen

Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgte in dem für den jeweiligen Zelltyp erforderlichen Medium in liegenden Kulturflaschen. Das Medienvolumen in kleinen Kulturflaschen ( $25\text{ cm}^2$  Adhärenzfläche) betrug 10-12 ml, in mittleren Kulturflaschen ( $75\text{ cm}^2$  Adhärenzfläche) 12-15 ml und in großen Kulturflaschen ( $125\text{ cm}^2$  Adhärenzfläche) 20-25 ml. Transfizierte Zelllinien mit definierter Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker wurden in entsprechendem Selektionsmedium kultiviert. Alle zwei bis vier Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt oder die Zellen auf mehrere Kulturflaschen aufgeteilt (gesplittet). Für letzteres wurde das Medium abgesaugt und die Kulturflasche mit PBS gespült. Dann wurden  $30\text{ }\mu\text{l}/\text{cm}^2$  Zellfläche Trypsin-EDTA zugegeben und für 1-2 Minuten bei RT oder bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Der Trypsinierungsvorgang wurde zudem unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Nach kräftigem Klopfen der Kulturflasche konnten die so abgelösten Zellen in dem entsprechenden Medium aufgenommen und auf zwei neue Kulturflaschen verteilt werden.



### **Kultivierung nicht-adhärenter Zellen**

Nicht adhärenente Zellen wurden in liegenden kleinen oder mittleren Kulturflaschen in den entsprechenden Medien kultiviert. Alle zwei bis vier Tage wurde die Hälfte der Zellsuspension abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

## **2.6 Herstellung von ULBP4-Transfektanten mittels Elektroporation**

Das synthetische ULBP4-Gen wurde wie unter 1.6 beschrieben in den AcGFP1-N1 Vektor kloniert. Um das Gen zu exprimieren, muss das Plasmid stabil in Zellen transfiziert werden. Hierfür wurde die Methode der Elektroporation gewählt. Es handelt sich hierbei um eine physikalische Transfektionsmethode, bei der eine Zellsuspension in Gegenwart einer DNS-Lösung einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt wird. Dadurch werden in der Zellmembran temporäre Poren erzeugt, durch welche die DNS in die Zelle gelangen kann. Für die Transfektion wurden C1R-Zellen gewählt, da diese natürlicherweise kein ULBP4 exprimieren (siehe Abb. 53, Anhang S.150). Es wurden C1R-Zellen mit den Plasmiden pcDNA3.1 (Invitrogen), pcDNA3.1-ULBP4 (Labor AG Falk), pAcGFP1-N1 (Clontech) und pAcGFP-ULBP4 transfiziert. Für die Elektroporation wurden  $4 \times 10^6$  Zellen geerntet und in einem 15 ml Reaktionsgefäß für 8 Minuten bei 540 g zentrifugiert. Anschließend wurden die sedimentierten Zellen in einem serumfreien Optimen-Medium gewaschen, da Serum im Medium die Transfektionseffizienz negativ beeinflussen kann. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 400 µl Optimem-Medium resuspendiert und in eine 0,4 cm Gene Pulser Küvette überführt und mit 20 µg durch Maxipräparation aufgereinigte DNS gemischt. Den Zellen wurden dann in dem Elektroporationssystem Gene Pulser Xcell™ einem elektrischen Impuls (155 V, 1000 µF) ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml des entsprechenden Mediums in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte überführt und über Nacht noch ohne Zugabe von Antibiotikum inkubiert. Am nächsten Tag wurde dann 0,4 mg/ml G418 (Neomycin) zugegeben. Das Gen für die Neomycin-Resistenz befindet sich auf dem pcDNA3.1- und dem pAcGFP-Plasmid und die transfizierten Zellen werden so unter Selektionsdruck gestellt. Nach der Expansion der Zellen wurden die GFP- und ULBP4 positiven Zellen durch eine Zellsortierung isoliert und einer weiteren Expansion unterzogen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ULBP4 einer natürlichen Expressionskontrolle unterliegt. Deshalb konnten keine hoch ULBP4 exprimierenden Zellen hergestellt werden (siehe Abb. 56, Anhang S.153). Für die Kontrolle der Transfektion wurde die RNS der Zellen isoliert, durch reverse Transkription in cDNS umgeschrieben und einer PCR mit ULBP4-spezifischen Primern unterzogen. Zudem wurden per

durchflusszytometrischer Messung die AcGFP- und ULBP4-Expression bestätigt. Die Funktionalität der Transfektanten wurde durch CFSE-Proliferationsversuche, Chromfreisetzungsversuchen und Degranulationsversuchen bestätigt (siehe Abb. 54, Abb. 55, Anhang S.151, 152).

### 3 Chromfreisetzungstest

#### Vorbereitung der Zielzellen

Zur Untersuchung der zellvermittelten Lyse (*cell mediated lysis*, CML) wurden Chromfreisetzungstests durchgeführt. Hierfür wurden die Zielzellen mit radioaktivem Chrom ( $\text{NaCrO}_4$ ) markiert, das bei einer Lyse der Zielzelle durch die Effektorzelle in den Überstand freigesetzt wird. Etwa  $3 \times 10^6$  Zellen wurden in 200  $\mu\text{l}$  FBS aufgenommen und mit 40-50  $\mu\text{l}$  radioaktivem Natriumchromat (ca. 85  $\mu\text{Ci}$ , in RPMI III verdünnt) für 90 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit wurde das radioaktive Nuklid von den Zellen aufgenommen. Die Zellen wurden dann zweimal mit 2 ml CML-Medium für 5 Minuten bei 540 g gewaschen und gezählt. Die Zielzellen wurden dann in das berechnete Endvolumen in entsprechender Zellzahl (2000 Zellen/50  $\mu\text{l}$ ) überführt.

#### Direkte zellvermittelte Lyse

Die Killerzellen wurden auf 96-Loch-Rundboden-Platten in abnehmenden Zellzahlen vierfach titriert, indem 50  $\mu\text{l}$  Volumen in 50  $\mu\text{l}$  vorgelegtes CML-Medium pipettiert wurden. Die Ratio lag zwischen 5:1 und 40:1. Die Chrom-markierten und gewaschenen Zielzellen wurden in konstanter Zahl von 2000 Zellen pro 50  $\mu\text{l}$  und Loch auf die Effektorzellen verteilt. Für jede Probe ergab sich dadurch ein Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$ . Nach Ablauf der vierstündigen Inkubationszeit bei 37 °C wurden 50  $\mu\text{l}$  des Überstandes pro Ansatz auf die Messplatten (Lumapplatten) übertragen. Alle Ansätze wurden als Duplikate angefertigt. Zur Bestimmung der spontanen Chromfreisetzung der Zielzellen wurde ein Ansatz nur mit Zielzellen und 50  $\mu\text{l}$  CML-Medium inkubiert. Für die maximale Chromfreisetzung wurden 50  $\mu\text{l}$  der Zielzellen direkt auf die Messplatte übertragen und dieser Wert wurde durch zwei geteilt, da aus dem Gesamtvolumen 50% auf die Messplatte übertragen wurde.

#### Messung und Auswertung

Die Messplatten wurden über Nacht zum Trocknen unter den Abzug gestellt und am nächsten Tag mit Folie beklebt und im *TOPCount*-Zählgerät gemessen. Die radioaktive Strahlung wurde durch die Beschichtung der Messplatten in Lichtquanten umgewandelt, die das

Zählgerät in Lichtemissionen pro Minute (*counts per minute*, cpm) berechnet. Der Prozentsatz spezifischer Lyse ergab sich aus der Formel:

$$\frac{\text{gemessene } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}}{(\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} : 2) - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}} \times 100$$

Der Wert der maximalen Chromfreisetzung musste durch zwei geteilt werden, um die Verdünnung der restlichen Proben zu berücksichtigen, da die Zielzellen für diesen Wert direkt und unverdünnt auf die Messplatte pipettiert wurden.

## 4 Durchflusszytometrie

### 4.1 Allgemein

Die Durchflusszytometrie am *fluorescence activated cell scanner* (FACS) ermöglicht eine Analyse der Expression von bestimmten Zellmolekülen über Fluoreszenz-markierte monoklonale Antikörper. Diese Antikörper sind spezifisch für Proteine auf der Zelloberfläche. Die Antikörper sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (direkte Markierung) oder werden mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (indirekte Markierung) nachgewiesen. Die Messung am Durchflusszytometer beruht darauf, dass diese Zellen einzeln in einem Probenstrom an einem Laserstrahl vorbeigeleitet und von ihm erfasst werden. Es kommt so zur Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe. Sie emittieren dann Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches von Photozellen im FACS qualitativ und quantitativ gemessen wird. Dadurch kann die Art der Markierung (Expression eines spezifischen Moleküls) und deren Intensität (Expressionsstärke des spezifischen Moleküls) auf jeder einzelnen Zelle bestimmt werden. Außerdem lässt sich mit dem Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) eine Aussage über die Größe der Zelle und mit dem Seitenstreulicht (*side scatter*, SSC) eine Aussage über deren Granularität treffen. Es ist also möglich die Zellen nach Größe, Granularität und Expression bestimmter Moleküle einzuteilen. Monoklonale Antikörper, die für FACS Analysen verwendet wurden, waren entweder mit FITC (Fluorescein-Isothiocyanat, Emissionsmaximum bei 530 nm), PE (Phycoerythrin, Emissionsmaximum bei 585 nm), PerCP (Emissionsmaximum bei 678 nm), APC (Allophycocyanin, Emissionsmaximum bei 767 nm) markiert. Am LSRII Gerät wurden zusätzlich APC-Cy7 (Emissionsmaximum bei 785 nm), PE-Cy7 (Emissionsmaximum bei 785 nm) und PE-Texas Red (Emissionsmaximum bei 615 nm) markierte Antikörper verwendet.

## 4.2 Direkte Färbung

Die zu messenden Zellen wurden abzentrifugiert und in FACS-Puffer (PBS, 1 % FBS, 0,1 %  $\text{NaN}_3$ ) aufgenommen. Pro Ansatz wurden 50  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension mit jeweils 2  $\mu\text{l}$  von bis zu sieben verschiedenen direkt markierten Antikörpern für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Pro Ansatz wurden zwischen 50.000 und 200.000 Zellen verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer für 5 Minuten bei 540 g gewaschen. Der Überstand wurde abgeschüttet und die markierten Zellen entweder in 100-150  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen und sofort gemessen, oder mit 100-150  $\mu\text{l}$  1% PFA/PBS fixiert und innerhalb der nächsten Tage gemessen. Zu jeder Messung wurden Positiv- und Negativkontrollen angefertigt. Für die Negativkontrollen dienten nicht-spezifisch-bindende Antikörper mit den jeweils in der Messung verwendeten Isotypen (Isotypkontrollen). Die fixierten FACS Proben wurden im Kühlschrank aufbewahrt, um ein Ausbleichen der Farbstoffe zu vermeiden.

## 4.3 Indirekte Färbung

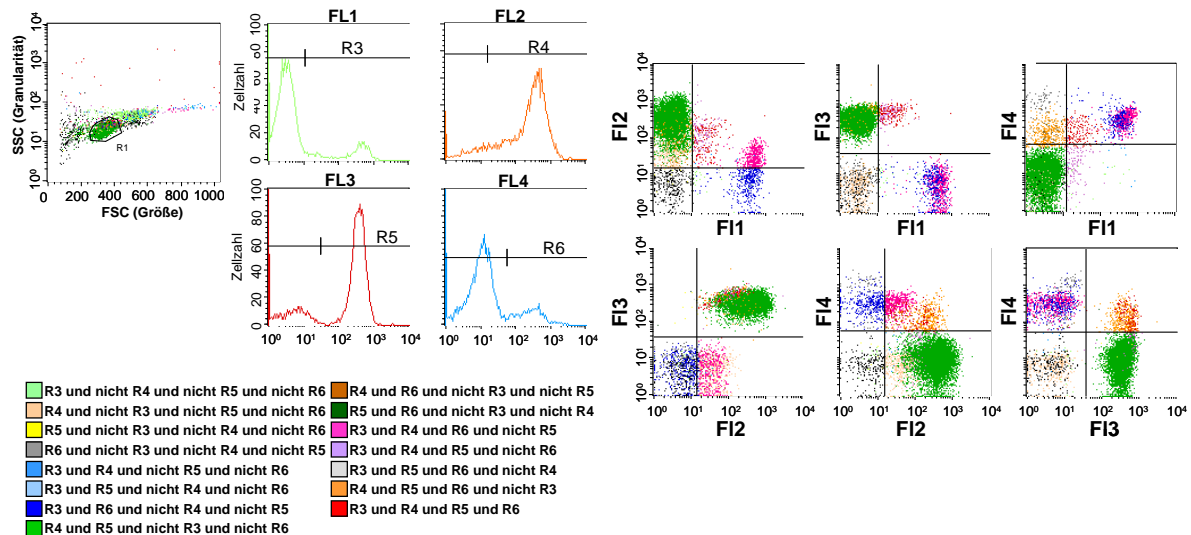
Unmarkierte Antikörper mussten indirekt nachgewiesen werden. Hierfür wurden die 50.000-200.000 Zellen wie unter 4.2 beschrieben mit 40  $\mu\text{l}$  des ersten unmarkierten Antikörpers (Primärantikörper) für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Durch einen Waschschriff wurde nicht gebundener Primärantikörper entfernt. Anschließend wurde für 30 Minuten mit einem PE-markierten Antikörper (Sekundärantikörper) inkubiert. Der spezie- und isotypspezifische Sekundärantikörper bindet an den konstanten Fc-Teil des Primärantikörpers. Nach einem Waschschriff wurden die Zellen in 100-150  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen und sofort gemessen oder mit 100-150  $\mu\text{l}$  1% PFA/PBS fixiert. Als Isotypkontrollen dienten nicht bindende und ebenfalls unmarkierte Primärantikörper.

## 4.4 Messung und Auswertung der Daten

Die Messung der gefärbten Proben erfolgte an zwei verschiedenen Geräten, abhängig davon, wie viele Fluoreszenzen gemessen werden sollten. Das FACSCalibur-Gerät ist mit zwei Lasern ausgestattet (488 nm Argon und 633 nm He/Ne). Direkt gefärbte Ansätze mit vier Farben (FITC, PE, PerCP und APC) oder indirekte Färbungen wurden an diesem Gerät gemessen. Am FACSCalibur muss man vor jeder Messung mit einfach gefärbten Ansätzen in jeder Farbe die spektralen Überlappungen zwischen den verschiedenen Fluorochromen kompensieren. Nachdem diese Einstellungen vorgenommen wurden, konnten die Zellen gemessen werden. Die Messung und die Auswertung erfolgten mit der CellQuest 5.2.1 Software (BD Biosciences). Das LSRII-Gerät (BD Biosciences) ist mit vier Lasern

ausgestattet: ein UV Laser (355 nm), ein blauer Saphirlaser (488 nm), ein violetter VioFlame PLUS Laser (405 nm) und ein He/Ne Laser (633 nm). So können mit diesem Gerät bis zu 18 verschiedene Fluorochrome unterschieden werden. Zudem verfügt das LSRII über ein digitales Aufnahmesystem, was auch eine nachträgliche Kompensation ermöglicht. Für die Messung und die Auswertung wurde die FACSDiva Software 5.0.2 (BD Biosciences) verwendet. Die in dieser Arbeit untersuchten Arthrose-Patienten wurden alle mit dem LSRII Durchflusszytometer und der FACSDiva Software (Institut für Immunologie, Universität Heidelberg) analysiert. Aufgrund der unterschiedlichen Aufnahmesysteme unterscheidet sich die Darstellung der durchflusszytometrischen Daten der Arthrose-Patienten immer von den Arthritis-Patienten (FACS Calibur, Institut für Molekulare Immunologie, München).

Bei indirekten FACS-Färbungen wird nur eine Fluoreszenz gemessen. Die einfachste Form der Auswertung stellt das Histogramm dar, welches bei indirekten Färbungen erstellt wird, da hier nur eine Fluoreszenz gemessen wird. Bei einem Histogramm wird die Stärke des Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen. Bei der Auswertung legt man die Histogramme der Isotypkontrolle und des zu untersuchenden Antikörpers übereinander und wertet den Unterschied in der Fluoreszenzstärke als positives Signal. Bei direkten Färbungen erfolgte die Auswertung nach einer mathematischen Methode aus der Mengenlehre, der booleschen Algebra (Abb. 11). Nachdem über Größe und Granularität die Lymphozyten definiert wurden (Region R1), wurden diese Zellen in den entsprechenden Histogrammen durch Regionen (R3-R6) für die jeweilige Fluoreszenz als positiv definiert. Diese Regionen wurden dann unter Verwendung der Operatoren UND und NICHT miteinander kombiniert. Eine Zelle kann beispielsweise positiv für Region 1, positiv für Region 2, negativ für Region 3 und positiv für Region 4 sein und wird als „R1 und R2 und R4 und nicht R3“ definiert. In dieser Weise wurden vier Fluoreszenzen miteinander kombiniert und es wurde allen möglichen Kombinationen jeweils eine Farbe zugeordnet. Man kann sich die farbig definierten Zellen dann in einem zweidimensionalen Dot-Plot darstellen lassen. So kann die Beziehung zweier Fluoreszenzen auf einer Zelle gezeigt werden. Damit alle Fluoreszenzen in ihrer Beziehung zueinander untersucht werden können, wird jede Fluoreszenz in Kombination mit allen anderen Fluoreszenzen dargestellt. Bei vier Farben lässt man sich also sechs Dot-Plots anzeigen. Durch die „Boolesche Methode“ kann man so nicht nur einfach- von doppelt-positiv markierten Zellen unterscheiden, sondern die farbliche Kodierung erlaubt auch eine Detektion von drei- oder vierfach positiven Zellen.



**Abb. 11 Auswertung direkter FACS-Färbungen nach der „Booleschen Methode“**

Dargestellt ist die exemplarische Auswertung einer FACS-Messung mittels der Booleschen Methode. Zunächst werden die Lymphozyten nach Größe und Granularität ausgewählt (Region R1). In Histogrammen werden die Lymphozyten dann durch die Regionen (R3-R6) für die jeweilige Fluoreszenz als positiv definiert. Die Regionen werden unter Verwendung der Operatoren UND und NICHT miteinander kombiniert und jede Kombination farblich markiert. Die farblich definierten Lymphozyten können dann in Dot Plots dargestellt werden. Dadurch kann die Beziehung zweier Fluoreszenzen auf einer Zelle dargestellt werden. Durch die farbliche Markierung werden zusätzlich drei- und vierfach gefärbte Zellen dargestellt.

## 5 CD107a-Degranulations-Versuch

Die Degranulation von NK- und T-Zellen wurde über den Nachweis der CD107-Oberflächenmobilisierung untersucht (Betts, Brenchley et al. 2003). Hierzu wurden die Zellen bei Anwesenheit des Antikörpers für CD107a mit Zielzellen stimuliert. CD107a ist ein Membranprotein der Lysosomen und daher auch ein Bestandteil der lytischen Granula von NK- und cytotoxischen T-Zellen. Erkennt die Killerzelle ihre Zielzelle und schüttet ihre Granula aus, so gelangen die CD107a-Moleküle transient auf die Zelloberfläche, wo sie dann durch den zugegeben fluoreszenzmarkierten Antikörper markiert werden können (Abb. 8, Einleitung S.15). Die daraus resultierende Fluoreszenzintensität, die am Durchflusszytometer gemessen wird, ist somit proportional zum Ausmaß der Degranulation und kann auf Einzelzellniveau nachgewiesen werden.

Für den Degranulations-Versuch wurden die Effektorzellen und die Zielzellen ( $0,3-0,5 \times 10^6$ ) in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Die Zellen wurden in Vertiefungen von 96-Loch U-Boden Platten in Tumormedium pipettiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Zielzellen angesetzt, da in diesem die spontane Degranulation beobachtet werden kann. Anschließend wurde je Ansatz 10  $\mu$ l Phycoerythrin (PE)- oder Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-markierter CD107a Antikörper zugegeben. Das Endvolumen der Ansätze betrug 200  $\mu$ l. Es folgte eine

einstündige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend wurde in jeden Ansatz 5 µl Monensin (2 mM) zugegeben. Monensin verhindert die Internalisierung der Oberflächenmoleküle und führt so zu einer Anreicherung von CD107a Molekülen auf der Zelloberfläche. Nach weiteren 3 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Ansätze mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen und für 8 Minuten bei 472 g zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit weiteren fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegengefärbt (z.B. CD3-PerCP, CD16-FITC, CD56-APC), um verschiedene NK- und T-Zellpopulationen im Durchflusszytometer bestimmen zu können. Die Auswertung erfolgte mittels der Booleschen Methode (4.4) und ist in Abb. 25 (S.76) exemplarisch dargestellt.

## 6 CFSE-Proliferations-Versuch

Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester (CFSE) ist ein Vitalfarbstoff, der passiv in die Zellen diffundiert und dort irreversibel an Zellproteine bindet. Intrazelluläre Esterasen spalten die Estergruppen des Moleküls ab und wandeln es so in einen fluoreszierenden, nicht mehr membrangängigen Farbstoff um. Nach einer Anregung mit einer Wellenlänge von 517 nm emittiert das Molekül grünes Licht. Die Fluoreszenz des Moleküls ist sehr stabil und hält über mehrere Wochen an. Mit jeder Proliferation der markierten Zelle, halbiert sich die Intensität, da sich die intrazellulären Proteine auf die zwei Tochterzellen verteilen. Dadurch kann der Verlauf der Proliferation durch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität am Durchflusszytometer verfolgt werden. Die PBMC wurden wie unter 2.1 beschrieben isoliert. Es können auch eingefrorene Zellen nach dem Auftauen wie unter 2.4 beschrieben verwendet werden.  $10 \times 10^6$  Zellen wurden abzentrifugiert und in 2,5 µM CFSE-Lösung (CFSE in RPMI III Medium) aufgenommen. Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, wurden die Zellen in PBS resuspendiert und bei 472 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 5 ml RPMI III + 10 % HS aufgenommen und für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit Medium wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und gezählt. Pro Ansatz wurden  $1 \times 10^6$  CFSE-markierte PBMC mit bestrahlten (80 Gy) Stimulatorzellen (C1R, C1R-pcDNA3.1, C1R-ULBP4syn) für 72 Stunden in 24-Loch-Platten inkubiert (Endvolumen pro Loch 2 ml). Das Effektor-Zielzell-Verhältnis betrug 2:1. Als Kontrolle der Proliferation diente ein Ansatz mit CFSE-markierten Zellen ohne Stimulatorzellen. Direkt nach der Färbung wurden  $0,1 \times 10^6$  CFSE-markierte Zellen abgenommen und mit 1 % PFA/PBS fixiert. Mit dieser Probe konnte die CFSE-Intensität an Tag 0 am Durchflusszytometer bestimmt werden. Nach 72 Stunden wurden die Zellen

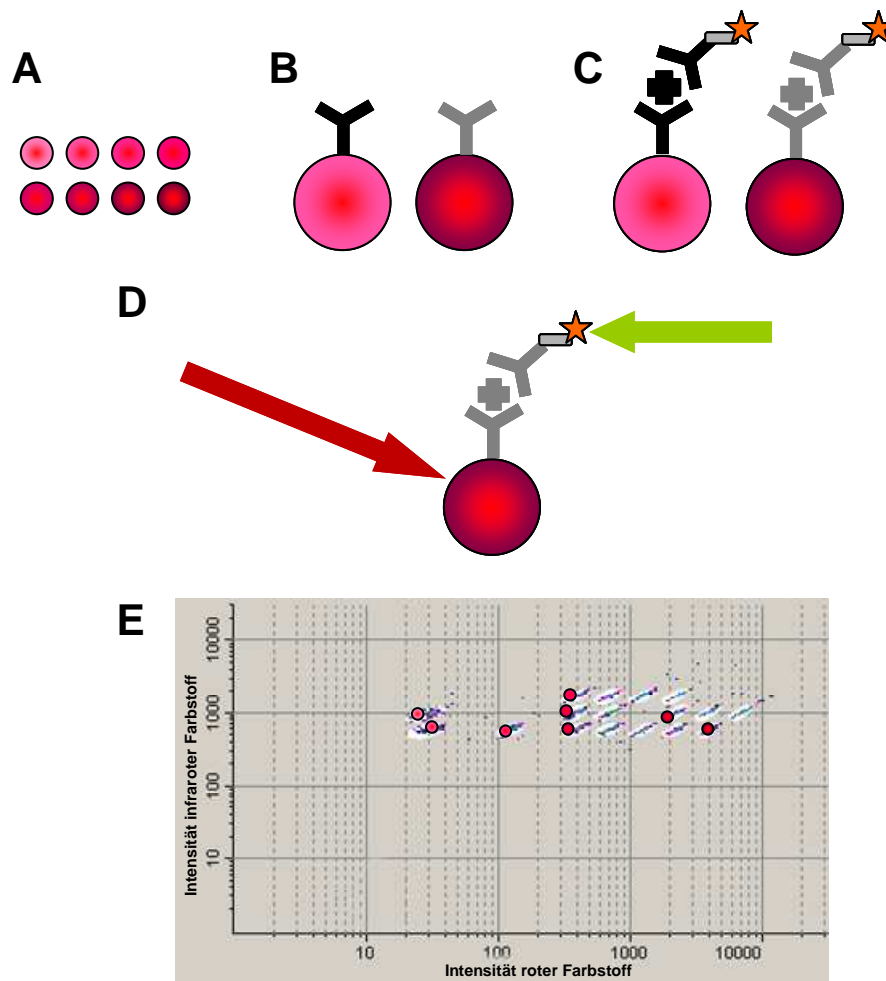
geerntet und in FACS-Puffer aufgenommen. Sie wurden dann wie unter 4.2 beschrieben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgefärbt, um bei der anschließenden Messung am Durchflusszytometer verschiedene Zellpopulationen unterscheiden und ihr Proliferationsverhalten bestimmen zu können. Die Auswertung erfolgte mittels der Booleschen Methode (4.4).

## 7 Multiplex-Analysen

### 7.1 Allgemein

Multiplex-Analysen basieren auf Polystyrol-Mikropartikel ( $\varnothing$  5,6  $\mu$ m), welche mit roten und infraroten Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt sind. Indem unterschiedliche Intensitäten der zwei Farbstoffe verwendet werden, können von der Firma Luminex so bis zu 100 verschiedene Gruppen an Mikropartikeln hergestellt werden (Abb. 12A). Nachdem jede Gruppe eine eigene „Signatur“ durch die individuelle Färbung trägt, können diese kombiniert werden und durch das Luminex-Gerät wieder ihrer ursprünglichen Gruppe zugeordnet werden. Dadurch können simultan mehrere Parameter (z.B. Zytokine/Chemokine oder DNS) in einer Probe gemessen werden, was den großen Vorteil dieser Methode gegenüber herkömmlichen Methoden darstellt. Die spezielle Oberfläche der Mikropartikel erlaubt eine Kopplung von „Fängermolekülen“, z.B. Antikörper, die gegen Zytokine gerichtet sind oder Oligonukleotide, an die einzelsträngige DNS binden kann (Abb. 12B). Hat ein Parameter erfolgreich gebunden, kann dieser in einem weiteren Schritt durch einen Sekundärantikörper mit Biotinrest erkannt werden (Abb. 12C). Phycoerythrin-(PE)-gekoppeltes Streptavidin markiert dann in einem letzten Schritt diese Sekundärantikörper oder die biotinylierten Oligonukleotide. Das Luminex-Gerät (LabScan<sup>TM</sup>100) basiert auf einer durchflusszytometrischen Methode, bei der die Mikropartikel durch eine Messküvette an zwei Laserstrahlen vorbeigeleitet werden. Der rote Detektionslaser erkennt die individuelle Färbung der Mikropartikel und kann sie so einer bestimmten Gruppe (Region) zuordnen (Abb. 12E). Ein grüner Laser erkennt simultan die orange Fluoreszenz des PE-gekoppelten Streptavidins und kann so dem Mikropartikel gleichzeitig eine Bindung des Parameters zuordnen (Abb. 12D). In dieser Arbeit wurden mit dem Multiplex-Verfahren Zytokin/Chemokin-Messungen und HLA-C/KIR-Typisierungen durchgeführt





**Abb. 12 Grundlage der Multiplex-Analyse**

Vereinfachte Darstellung der Multiplex-Analyse. Die Mikropartikel sind mit roten und infraroten Fluoreszenzfarbstoffen in unterschiedlichen Intensitäten der zwei Farbstoffe gefärbt und können so voneinander unterschieden werden (A). Auf den Mikropartikeln sind spezifische Antikörper oder Oligonukleotide gebunden (B). Ein daran gebundener Parameter wird durch einen biotinylierten Sekundärantikörper und PE-gekoppeltem Streptavidin markiert (C). Im Luminex-Gerät erkennt der rote Detektionslaser die individuelle Färbung der Mikropartikel (D) und kann sie so einer bestimmten Gruppe (Region) zuordnen (E). Der grüne Laser erkennt simultan die orange Fluoreszenz des PE-gekoppelten Streptavidins und kann dem Mikropartikel gleichzeitig eine Bindung des Parameters und deren Intensität zuordnen.

## 7.2 HLA- und KIR-Typisierung mittels Luminex Software

Für die HLA-C- und KIR-Typisierungen wurden die Multiplex-Assays der Firma OneLambda verwendet. Hierbei sind an die Mikropartikel sequenzspezifische Oligonukleotidsonden gebunden, an die bestimmte Allelsequenzen der HLA-C bzw. KIR-Gene binden können. In dieser Arbeit wurde so der Genotyp für HLA-C und den KIR-Lokus von gesunden Normal Spendern und den Patienten hochauflösend bestimmt.

Die Typisierung wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die zu untersuchende DNS wird in einer Polymerase-Kettenreaktion mit spezifischen biotinylierten Primern amplifiziert. Hierbei werden mit den generischen Primern Exon 2 und Exon 3 des

HLA-C Gens und Exon 3+4, Exon 5 und Exon 7-9 des KIR Locus amplifiziert. Exon 2 und 3 von HLA-C kodieren für die  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domäne der Peptidbindungsfurche und stellen die hoch polymorphen Sequenzen der HLA-Moleküle dar, in denen sich die verschiedenen Allele unterscheiden. Die amplifizierten Exons der KIR-Gene kodieren für die verschiedenen extra- und intrazellulären Domänen der 16 KIR-Gene, in denen sich sowohl die Rezeptor- als auch die allelspezifischen Unterschiede befinden. Nach der PCR erfolgten eine Denaturierung der doppelsträngigen DNS-Amplifikate und eine Neutralisation dieser Reaktion. Während eines Hybridisierungsschrittes können die biotinylierten einzelsträngigen DNS-Amplifikate über ihre komplementären Oligonukleotidsonden an die Mikropartikel binden. Durch mehrmaliges stringentes Waschen werden nicht spezifisch gebundene DNS-Stränge entfernt. Anschließend werden die, über die Primer biotinylierten, DNS-Stränge mit PE-gekoppeltem Streptavidin (SAPE) markiert. Die Intensität des SAPE-Signals stellt ein Maß für Hybridisierung dar und kann durch die Messung an einem Luminex-Durchflussanalysegerät (LabScan<sup>TM</sup>100) detektiert werden.

Die Messung wurde am LabScan<sup>TM</sup>100-Gerät mit der Software Luminex 100 IS 2.3 durchgeführt. Zur Auswertung wurden die Dateien mit der HLA-Visual Software (Version 2.2.0, OneLambda) analysiert. Vor jeder Messung muss das Gerät mit Kalibrierungs- und Kontrollmikropartikeln (LiquiChip) kalibriert und kontrolliert werden. Die Software erlaubt eine intermediär auflösende Typisierung der Allele. Vom HLA-C sind heute 350 Allele bekannt, die 274 Proteine kodieren (IMGT/HLA Datenbank). Von den 16 KIR-Genen sind mittlerweile über 100 Allele bekannt (Carrington 2003). HLA-C und KIR-Allele werden in ähnlicher Weise benannt, indem ein mehrstelliger Zahlencode nach den Richtlinien der NMDP (National Marrow Donor Program) verwendet wird. HLA-Gene werden durch einen 8-stelligen Zahlencode unterschieden. Die ersten zwei Ziffern beschreiben immer das Allel und die beiden nächsten Ziffern den Subtyp des Allels. Allele, deren Zahlencodes sich in den ersten vier Stellen unterscheiden, weisen immer eine Nukleotidaustausch auf, der zu einer veränderten Aminosäuresequenz des kodierten Proteins führt. Allele die sich nur durch stille, also nicht-kodierende Nukleotidaustausche unterscheiden, werden durch Unterschiede an vierter und fünfter Stelle des Codes beschrieben. Die letzten Ziffern bezeichnen Allele, die nur Veränderungen in nicht-kodierenden Bereichen, wie Introns oder Promotorregionen, aufweisen. Bei den KIR-Genen unterscheiden die ersten drei Zahlen Exonsequenzen, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen. Die nächsten zwei Zahlen bezeichnen Allele, die nicht-kodierende Veränderungen aufweisen. Die letzten Ziffern bezeichnen wieder Allele, die nur Veränderungen in nicht-kodierenden Bereichen aufweisen. Die HLA-Visual Software

liefert eine intermediär auflösende Typisierung mit einer Genauigkeit von mehr als 2 Ziffern nach dem „\*“- z.B. Cw\*0601. Bei der Bestimmung der relativen Häufigkeiten der HLA-C- bzw. KIR-Allele wurde auf eine Berechnung nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht verzichtet, da es sich in meinem Fall nicht um die Frequenzen einzelner Allele, wie z.B. Cw\*0601 handelt, sondern die relativen Frequenzen ganzer Allel-Gruppen (z.B. alle Cw\*06-Allele) berechnet wurden.

### 7.3 Zytokinmessung mittels Bioplex Software

Für die Zytokin- und Chemokinmessungen wurden die Multiplex-Assays der Firma BioRad verwendet. Hierbei sind an unterschiedliche Mikropartikel Antikörper gebunden, die gegen unterschiedliche Zytokine oder Chemokine gerichtet sind. Mit dem Luminex-Gerät konnten so im Serum oder Plasma der Spender und Patienten bis zu 50 Analyte simultan gemessen werden.

Die Durchführung erfolgte laut Herstellerprotokoll. Vor der Messung wurden die Proben 1:1 mit Serum Diluent (BioRad) verdünnt, wodurch die Sensitivität erhöht wird. Die Mikropartikel und das Serum wurden in einer 96-Loch-Bio-Plex MCV-Platte miteinander inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen wurden ungebundene Zytokine/Chemokine und alle anderen Bestandteile des Serums/ Plasmas entfernt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem sekundären biotinylierten Detektionsantikörper, welcher nach einigen Waschschritten mit PE-gekoppeltem Streptavidin markiert wurde. Zusätzlich zu den Proben wurden immer Standardkonzentrationen jedes Zytokins/Chemokins eingesetzt, welche in einer Verdünnungsreihe hergestellt wurden und so die Quantifizierung jedes Analyten über individuelle Standardkurven ermöglichen. Die Fluoreszenzintensität stellt ein Maß für die Bindung der Zytokine/Chemokine dar und kann durch die Messung an einem Luminex-Durchflussanalysegerät (LabScan<sup>TM</sup>100) detektiert werden.

Die Messung wurde am LabScan<sup>TM</sup>100-Gerät mit der Software Bioplex Manager 4.1.1 durchgeführt. Mit dieser Software wurde anschließend auch die Auswertung durchgeführt, da diese über die einzelnen Standardkurven der Analyte die jeweiligen Zytokin- oder Chemokinkonzentrationen berechnen kann und so eine genaue Quantifizierung der Analyte erlaubt.

## 8 Herstellung monoklonaler ULBP4-spezifischer Antikörper

Da ULBP4 (Antigen für die Immunisierung) nicht in aufgereinigter Form vorlag, wurde für die Erzeugung der monoklonalen Antikörper ein synthetisches Peptid verwendet. Das Peptid **KNLFLQYNSDNNMVC** stellt eine Aminosäuresequenz aus der  $\alpha$ 1-Domäne von ULBP4 dar (siehe Abb. 13), welche in ULBP1-3 nicht zu finden ist, obwohl sich diese in ihren  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domänen stark ähneln.

```
MRRISLTSSPVRLLLFLLLLLLIALEIMVGGHSLCFNFTIKSLSRPGQPWC
EAQVFLNKNLFLQYNSDNNMVCPLGLLGKKVYATSTWGELTQTLGEV
GRDLRMLLCDIKPQIKTSDPSTLQVEMFCQREAERCTGASWQFATNGE
KSLFLDAMNMTWTVINHEASKIKETWKKDRGLEKYFRKLSKGDCHWL
REFLGHWEEAMPEPTVSPVNASDIHWSSSSLPDRWIIILGAFILLVLMGI.V
LICVWWQNGEWQAGLWPLRTS.
```

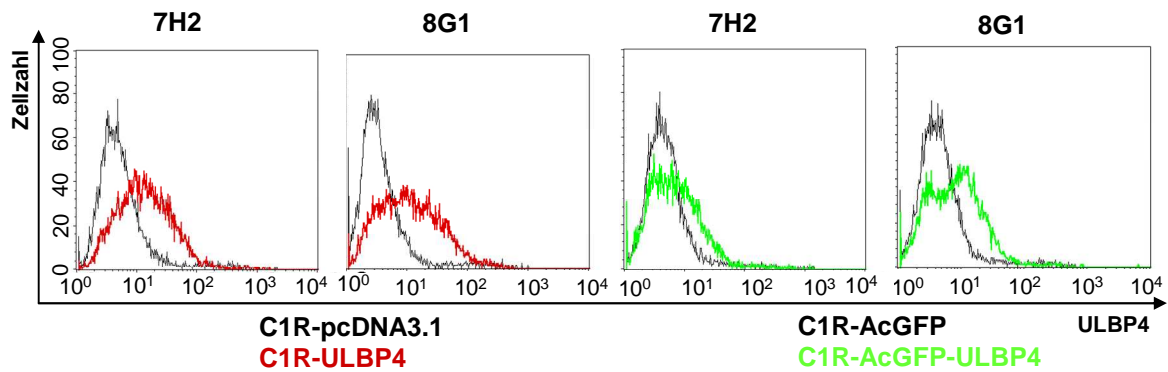
Signal-Sequenz     $\alpha$ 1-Domäne     $\alpha$ 2-Domäne    Transmembrandomäne    intrazytoplasmatische Domäne

Abb. 13      Aminosäuresequenz ULBP4wt

Es wurden Long-Evans-Ratten subkutan mit dem Peptid und CFA (*complete Freud's adjuvant*) immunisiert (Labor Dr. E. Kremmer, GSF). Nach 7 Wochen erfolgte eine Auffrischung der Immunisierung („Boost“). 6 Tage nach der Auffrischung wurden B-Zellen aus der Milz der Ratten isoliert und mit Ag8-Myelomzellen fusioniert. Die daraus resultierenden Hybridomzellen vereinigen in sich die Fähigkeiten einer Plasmazelle Antikörper zu produzieren, und die Fähigkeit einer Tumorzelle sich unbegrenzt zu teilen. Nach einer Klonierung und Expansion dieser Zellen wurden 17 Hybridomüberstand in einem ersten Antikörpertest getestet.

Hierzu wurden C1R-pcDNA3.1, C1R-ULBP4syn, C1R-AcGFP1-N1 und C1R-AcGFP-ULBP4syn in einer indirekten FACS-Färbung mit den Hybridomüberständen inkubiert. Eine spezifische Bindung der im Hybridomüberstand enthaltenen Antikörper wurde dann durch einen Sekundärantikörper detektiert. 5 der Überstände zeigten eine spezifische ULBP4-Bindung auf den C1R-ULBP4syn-Zellen. Die ULBP4-Bindung auf den C1R-AcGFP-ULBP4syn Zellen war ebenfalls spezifisch, fiel jedoch etwas schwächer aus, was durch Konformationsänderungen des ULBP4-Moleküls durch den AcGFP-Rest hervorgerufen werden kann, da die Antikörper aus sterischen Gründen oft nicht mehr so gut binden können. Nach mehrmaliger Reklonierung wurden die fünf Antikörperkandidaten erneut in einer FACS-Färbung mit den C1R-Transfektanten getestet. Die erhaltenen monoklonalen ULBP4-

Antikörper 7H2, 7H7, 8G1, 1B3 und 6F4 zeigen eine gute Bindung von ULBP4<sub>syn</sub> auf der Oberfläche der Transfektanten. Das AcGFP-Fusionsprotein wird nur von den Antikörpern 7H2 und 7H7 schwach gebunden, die Antikörper 1B3, 8G1 und 6F4 erkennen das Fusionsprotein nicht. In Abb. 14 sind exemplarisch die FACS-Färbungen mit den Antikörpern 7H2 und 8G1 dargestellt.



**Abb. 14** Untersuchung der ULBP4-Expression von C1R-Transfektanten mit den ULBP4-Antikörpern

Dargestellt ist die durchflusszytometrische Färbung der ULBP4-Transfektanten C1R-ULBP4 (rote Linie) und C1R-AcGFP-ULBP4 (grüne Linie) mit den monoklonalen Antikörpern ULBP4-7H2 und ULBP4-8G1. Als Vektorkontrollen dienten C1R-pcDNA3.1- und C1R-AcGFP-Transfektanten (schwarze Linien). Die Bindung der unmarkierten ULBP4-Antikörper wurde über einen PE-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen.

## 9 Statistik

Die Berechnung der statistisch signifikanten Unterschiede der synovialen und peripheren NK-Zellen und der Zytokinmessungen erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test, da es sich auf Grund der Ausreißer nicht um normalverteilte, sondern um nicht-parametrische Datensätze handelt. Für die Berechnung wurde die Software SPSS 16.0 verwendet.

## E Ergebnisse

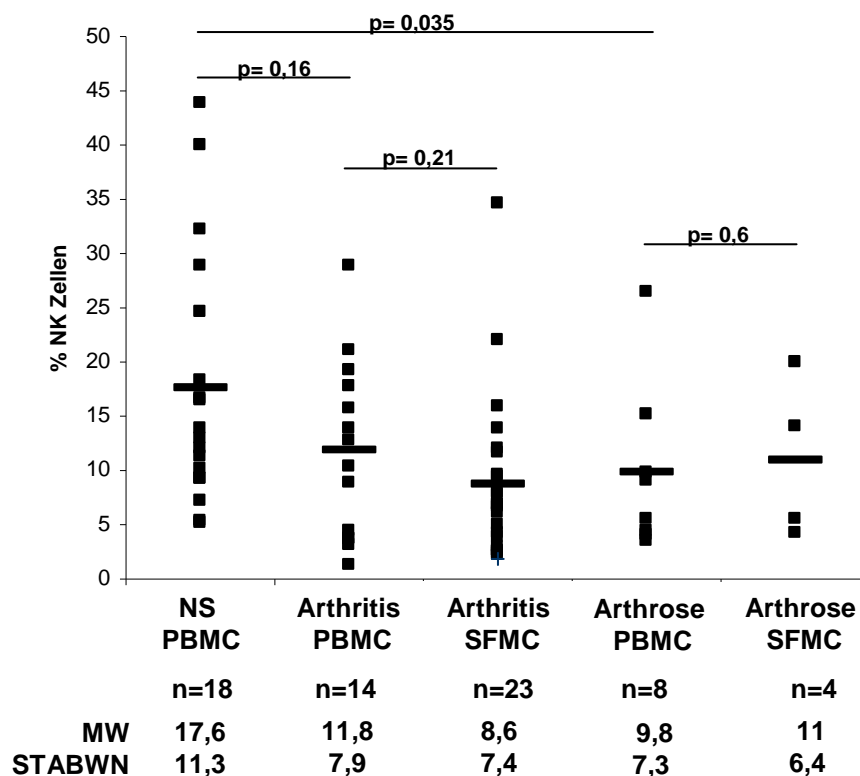
### 1 NK-Zellen im Kontext autoimmuner und nicht-autoimmuner Gelenkerkrankungen

Im Zuge dieser Arbeit wurden die NK-Zellen im Kontext verschiedener Gelenkerkrankungen (Arthropathien) untersucht. Hierbei lag der Fokus auf dem Vergleich von autoimmunen Gelenkerkrankungen (Arthritiden) mit nicht-autoimmunen Gelenkerkrankungen (Arthrosen). Die Rheumatoide Arthritis (RA) zählt zu den entzündlichen, autoimmunen Erkrankungen, und verläuft als rheumatisch bedingte Gelenkerkrankung häufig in Schüben. Zu dem Kollektiv der Arthritiden gehören auch drei weitere entzündliche, aber nicht-autoimmune Erkrankungen: die Lyme-Arthritis (Gelenkentzündung nach Infektion mit dem Bakterium *Borrelia burgdorferi*), die aktivierte Arthrose (Entzündung des Gelenks auf der Grundlage einer Arthrose) und die Arthritis urica (Gicht, Stoffwechselkrankheit mit Ablagerung von Harnsäurekristallen in Gelenken). Während die meisten Patienten eine Rheumatoide Arthritis vorwiesen, lag von diesen drei Erkrankungen jeweils nur eine Probe vor. In den Tabellen Tab. 7 und Tab. 8 (S. 32, 33) sind die Informationen zu den Patientenkollektiven gezeigt. Die drei nicht-autoimmunen Krankheiten, zwei Reaktive Arthritis-Patienten, fünf Patienten mit undifferenzierter Oligo- und Polyarthritis, sowie fünf Patienten mit unbekannter Diagnose wurden zusammen mit den Rheumatoiden Arthritis-Patienten als „Arthritis-Patienten“ zusammengefasst, da sich bezüglich der untersuchten Parameter keine signifikanten Unterschiede aufweisen ließen. Als Vergleich zu den autoimmunen Gelenkerkrankungen wurde ein Gonarthrose-Patientenkollektiv (Arthrose des Kniegelenks) untersucht. Bei Arthrose handelt es sich um eine degenerative Gelenkerkrankung nicht-autoimmunen Ursprungs. Im Vergleich zu den Arthritiden findet hierbei eine leichtere Entzündungsreaktion der Gelenke (zunächst Knorpel, später auch Knochen) statt, welche durch Abnutzung oder ein Trauma ausgelöst wurde. Die Synovialflüssigkeit enthält in diesem Fall wesentlich weniger lymphozytäres Infiltrat. Aus diesem Grund stand von diesen Proben nur wenig Zellmaterial für funktionelle Untersuchungen zur Verfügung. Als weiteres Kontrollkollektiv wurden Blutproben von gesunden Spendern untersucht. Für die phänotypische Untersuchung des NK-Zellinfiltrats wurden mononukleäre Zellen wie unter 2.2 beschrieben (Methoden, S. 43) aus der Synovialflüssigkeit (SFMC) der Kniegelenke der Patienten, und wie unter 2.1 beschrieben (Methoden, S. 42) aus dem Blut der Patienten und Normalspender (PBMC) isoliert. Anschließend wurde das zelluläre Infiltrat phänotypisch mittels Durchflusszytometrie in

Bezug auf 25 Oberflächenmarker charakterisiert, wobei der Schwerpunkt auf der Bestimmung der NK-Zellen lag.

## 1.1 Der Einfluss der Autoimmunität auf das NK-Zellinfiltrat

Seit 1980 konnte in mehreren kleinen Studien gezeigt werden, dass bei verschiedenen autoimmunen Erkrankungen eine Assoziation mit einer verringerten Frequenz an peripheren NK-Zellen vorliegt (Hoffman 1980, Herold, Huen et al. 1984, Negishi, Waldeck et al. 1986, Lorini, Moretta et al. 1994, French and Yokoyama 2004). Diese NK-Zell Degeneration konnte auch bei Patienten mit juveniler Rheumatoider Arthritis und der Rheumatoiden Arthritis in der Peripherie gezeigt werden (Grom, Villanueva et al. 2003). Die Frequenz der NK-Zellen unterscheidet sich aber laut Literatur nicht immer zwischen den SFMC und den PBMC von Arthritis-Patienten (de Matos, Berg et al. 2007).



**Abb. 15** Frequenz der NK-Zellen in Synovialflüssigkeit und Blut

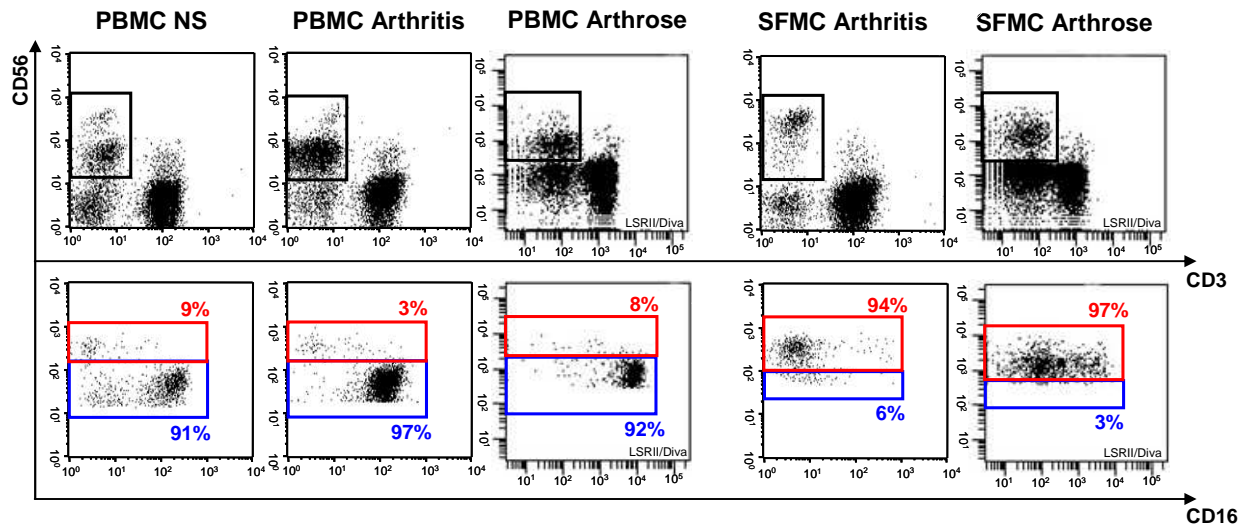
Die aus der Synovialflüssigkeit (SFMC) und dem Blut isolierten (PBMC) mononukleären Zellen wurden mit CD56 und CD3 Antikörpern gefärbt. Bei der FACS-Auswertung wurden die Lymphozyten nach Größe und Granularität definiert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> NK-Zellen an den gesamten Lymphozyten bestimmt. Die Linie markiert den Mittelwert (MW). STABWN: Standardabweichung. NS: Normalspender. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte nach dem Mann-Whitney-U-Test.

Der prozentuale Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten im Blut der Arthritis-Patienten ( $n=14$ ,  $11,8\pm 7,9$  %) ist nicht signifikant niedriger als im Blut der Normalspender ( $n=18$ ,  $17,6\pm 11,3$  %) ( $p=0,16$ ), obwohl man eine Tendenz dahingehend erkennen kann. In der Synovialflüssigkeit der Arthritis-Patienten ist die Frequenz der NK-Zellen im Vergleich zu den autologen PBMC ebenfalls nicht signifikant erniedrigt ( $n=23$ ,  $8,6\pm 7,4$  %,  $p=0,21$ ). Im Blut ( $9,8\pm 7,3$  %) der Gonarthrose-Patienten ( $n=8$ ) ist die NK-Zell-Frequenz im Vergleich zu den Normalspendern dagegen signifikant verringert ( $p=0,035$ ). Die NK-Zell-Frequenz zeigt hier jedoch keinen Unterschied zu den autologen Synovialflüssigkeiten ( $n=4$ ,  $11\pm 6,4$  %) und zu den PBMC der autoimmunen Gelenkserkrankungen ( $11,8\pm 7,9$  %) ( $p=0,6$ ). Dieser Aspekt widerspricht den bisherigen Veröffentlichungen, welche eine verringerte Frequenz der NK-Zellen mit Autoimmunität korrelieren. Die Untersuchung der Patienten ergab nur eine signifikante Abnahme der NK-Zell-Frequenz in der Peripherie der Gonarthrose-Patienten. Als weiteres Kontroll-Patientenkollektiv wurden in dieser Arbeit Psoriasis vulgaris Patienten untersucht. Die durchflusszytometrischen Analysen ergaben, dass auch bei dieser autoimmunen Erkrankung in der Peripherie keine verringerte NK-Zell-Frequenz vorliegt (siehe Abb. 37, S. 100).

## 1.2 Anreicherung der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit

Alle NK-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche CD56, jedoch in unterschiedlicher Dichte. CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimieren CD56 zu einem moderatem Niveau und stellen bei gesunden Normalspendern 90% der peripheren NK-Zellen dar. Die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimieren CD56 sehr hoch und stellen 10% der peripheren NK-Zellen dar (Cooper, Fehniger et al. 2001). Die Mehrzahl der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimiert CD16 (Fcγ-Rezeptor III), die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen sind dagegen meistens CD16 negativ. Bei Normalspendern findet man im Blut also zwei NK-Zell-Subpopulationen: CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+/-</sup> NK-Zellen und CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-/(+)</sup> NK-Zellen (Lanier, Le et al. 1986), die sich durchflusszytometrisch gut darstellen lassen (siehe Abb. 16A).

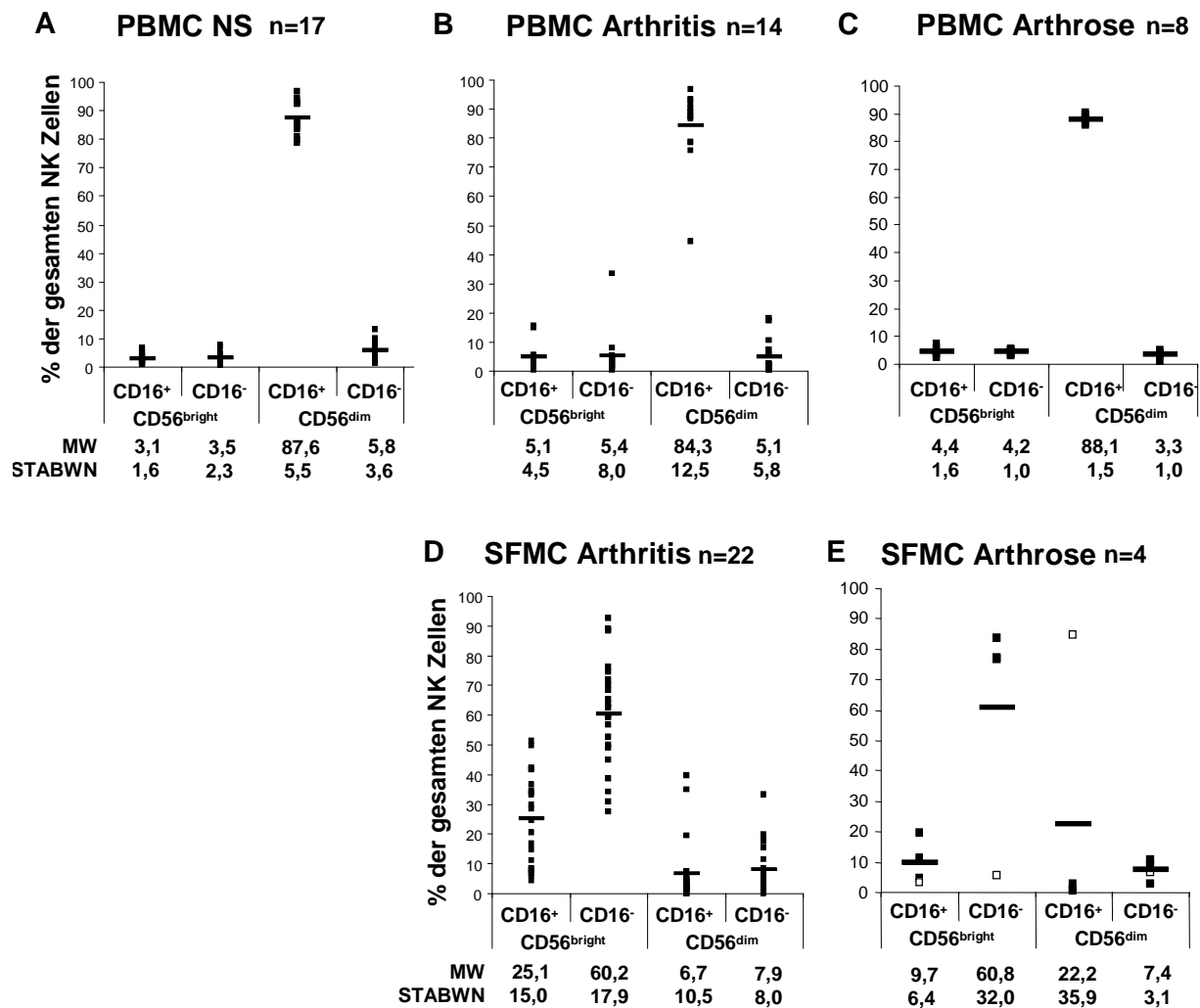




**Abb. 16 NK-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut und in der Synovialflüssigkeit**

Dargestellt ist exemplarisch eine durchflusszytometrische Färbung von PBMC und SFMC mit CD56 und CD3 Antikörpern. Gegatet auf Lymphozyten und CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> NK-Zellen. In der Peripherie (PBMC) teilen sich die NK-Zellen immer in ca. 90% CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+/+</sup> und 10% CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-/+</sup> Zellen auf. Es treten hierbei keine Unterschiede zwischen Normalspendern und Arthritis- oder Arthrose-Patienten auf. In den Synovialflüssigkeiten (SFMC) überwiegen bei Arthritis- und Arthrose-Patienten die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen gegenüber den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Die Arthrose-Patienten wurden immer am LSRII Durchflusszytometer gemessen und mit der Diva Software ausgewertet. Daher können sie sich in der Darstellung von den Messungen und Auswertungen, die mit dem Calibur Durchflusszytometer und der CellQuest Software durchgeführt wurden, unterscheiden.

Im Blut der Arthritis und Arthrose-Patienten liegen die NK-Zellen im Vergleich zu den Normalspendern in der gleichen Verteilung vor, unabhängig davon ob es sich um autoimmune oder nicht-autoimmune Erkrankungen handelt (Abb. 16). NK-Zellen stellen auch in der Synovialflüssigkeit eine signifikante Fraktion der infiltrierenden Lymphozyten dar. Interessanterweise dominiert aber in den Synovialflüssigkeiten unseres Arthritis-Patientenkollektivs die CD56<sup>bright</sup> Subpopulation, wie in Publikationen bereits beschrieben (Dalbeth and Callan 2002, Dalbeth, Gundle et al. 2004). Dies ist unabhängig vom Krankheitsbild, da die Dominanz dieser Subpopulation bei Rheumatoider Arthritis und Psoriasis Arthritis als auch bei Patienten mit Pleuritis, welche auch bei rheumatischen Krankheiten auftreten kann, beobachtet werden kann (Dalbeth and Callan 2002, Dalbeth, Gundle et al. 2004). Diese Verschiebung der NK-Zellverteilung in der Synovialflüssigkeit der Patienten konnte auch in dem hier untersuchten Patientenkollektiv gezeigt werden (siehe Abb. 16B). Nachdem alle NK-Zellen CD56 exprimieren und sich die CD56-Expression bei Aktivierung von NK-Zellen erhöhen kann, kann man die Infiltration nicht direkt mit der CD56-Expression korrelieren. NK-Zellen sind zusätzlich durch die Expression von CD16 charakterisiert, welches bei Normalspendern überwiegend auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde die Korrelation der Infiltration mit der Abwesenheit von CD16 auf synovialen NK-Zellen untersucht (Abb. 17).



**Abb. 17 CD16-Expression auf NK-Zellen im Blut und in der Synovialflüssigkeit**

Durchflusszytometrische Färbung mit CD56, CD16 und CD3 Antikörpern von PBMC und SFMC von Normalspendern, Arthritis- und Arthrose-Patienten. Für die Auswertung wurden die Lymphozyten nach Größe und Granularität definiert und die CD16-Expression auf den CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen untersucht. Einteilung in CD16<sup>+</sup> im Vergleich zu CD16<sup>-</sup> CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. Dargestellt ist die Auswertung des prozentualen Anteils bezogen auf die Anzahl der gesamten NK-Zellen. **A.** PBMC Normalspender, n=17 **B.** PBMC Arthritis-Patienten, n=14 **C.** PBMC Arthrose-Patienten, n=8 **D.** SFMC Arthritis-Patienten, n=22 **E.** SFMC Arthrose-Patienten, n=4 mit einem „Ausreißer“ (□). Die Linie markiert den Mittelwert (MW), STABWN: Standardabweichung

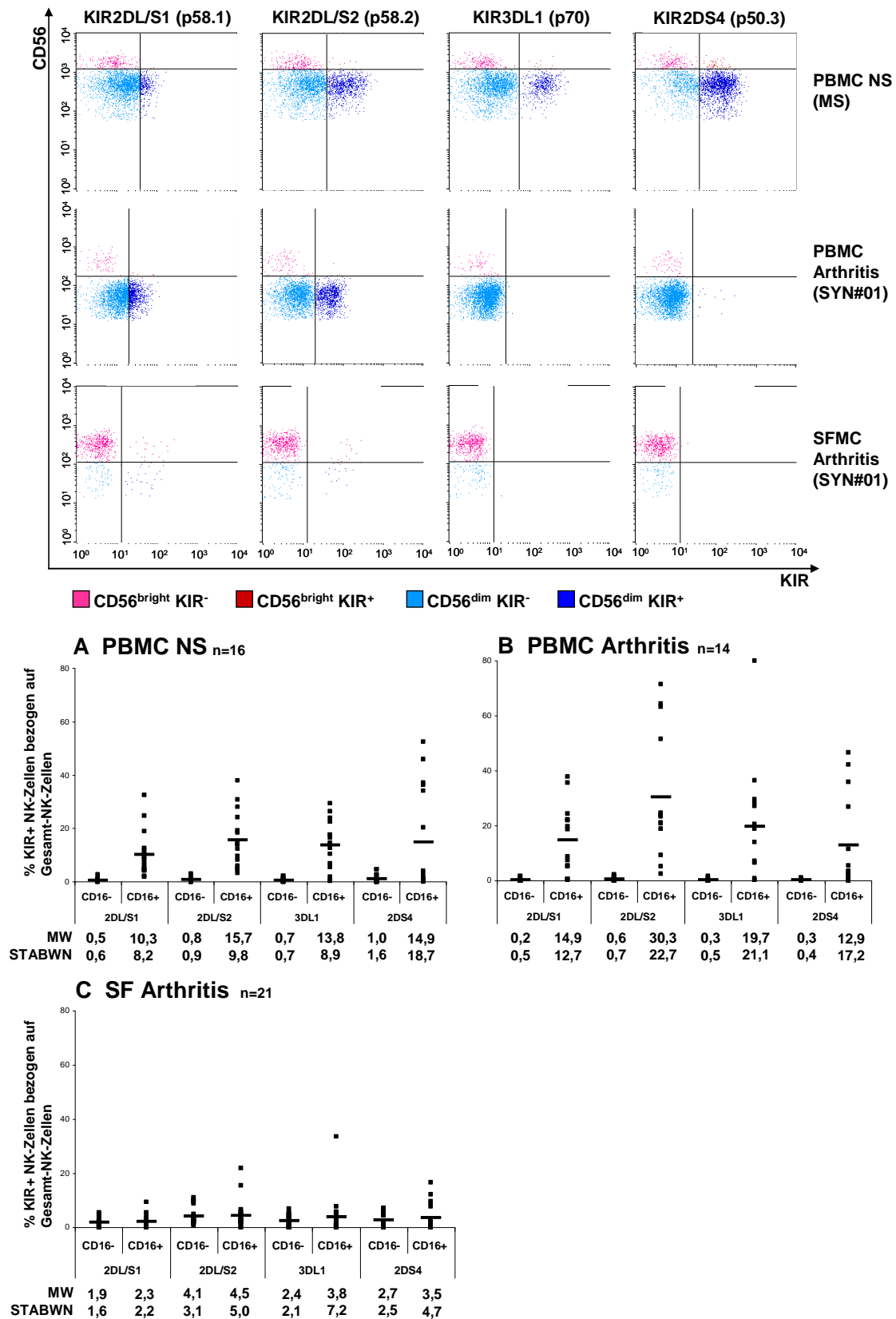
Abb. 17 zeigt, dass CD16-positive CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen im Blut von Normalspendern (Abb. 17A, 87,6±5,5 % der gesamten NK-Zellen), im Blut von Patienten mit Gelenkentzündung (Abb. 17B, 84,3±12,5 %) und von Arthrose-Patienten (Abb. 17C, 88,1±1,5 %) die größte NK-Zellfraktion darstellen. Durch die oben gezeigte Verschiebung der NK-Zell-Subpopulationen, dominieren folglich in der Synovialflüssigkeit von Arthritis (Abb. 17D, 60,2±17,9 %) und Arthrose-Patienten (Abb. 17E, 60,8±32,0 %) im Vergleich mit den autologen PBMC hoch signifikant die CD16-negativen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (Arthritis SFMC p<0,001, Arthrose SFMC p=0,007). Dieser signifikante Unterschied kommt trotz eines „Ausreißers“ unter den Gonarthrose-Patienten zustande (gekennzeichnet durch □ in Abb. 17E). Die Synovialflüssigkeit der Arthrose-Patienten wurde bei einer Operation zum Kniegelenkersatz

entnommen. Die sonst gelbliche Synovialflüssigkeit des „Ausreißers“ war durch die Erythrozyten rot gefärbt, und deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die Synovialflüssigkeit während der Operation durch eine Einblutung mit peripheren Lymphozyten „kontaminiert“ worden ist. Die noch in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten vorhandenen CD16<sup>+</sup> NK-Zellen exprimieren ein hohes Niveau an CD56, was auf einen aktivierten Zustand hindeuten könnte. Dieser Unterschied ist hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Interessanterweise ist die CD56-Expression auf CD16<sup>+</sup> NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit von Arthrose-Patienten nicht signifikant erhöht ( $p = 0,07$ , ohne Ausreißer □). Bei der Beurteilung der statistischen Auswertung darf die geringe Patientenzahl im Gonarthrose-Kollektiv ( $n = 4$ ) nicht vernachlässigt werden. Ob wirklich ein Unterschied in der Aktivierung synovialer NK-Zellen zwischen einer autoimmunen und einer nicht autoimmunen Krankheit vorliegt, kann erst durch die Analyse weiterer Arthrose-Patienten beantwortet werden. Deutlich ist aber, dass neben der Dominanz der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit die verbleibenden CD16<sup>+</sup> NK-Zellen eine erhöhte CD56-Expression aufweisen. CD16 ist auf synovialen NK-Zellen aber sehr heterogen verteilt, deshalb kann dieser Marker nicht als zufriedenstellender Infiltrationsmarker für synoviale NK-Zellen betrachtet werden.

**Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten eine Dominanz an CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen beobachtet werden kann. In den autologen PBMC liegen die Subpopulationen im Vergleich zu Normalspendern unverändert vor. Diese Veränderung im NK-Zell-Repertoire ist unabhängig vom Krankheitsbild, da kein Unterschied zwischen autoimmunen und nicht-autoimmunen gefunden werden konnte. Es zeigte sich die Tendenz einer erhöhten CD56-Expression auf den synovialen CD16<sup>+</sup> NK-Zellen von autoimmunen Arthritis-Patienten im Vergleich zu nicht autoimmunen Patienten. Trotz der Verschiebung der NK-Zell-Subpopulationen findet man in der Synovialflüssigkeit immer noch CD56<sup>dim</sup> Zellen. CD56 und CD16 können also nicht als zufriedenstellende Infiltrationsmarker auf NK-Zellen in die Synovialflüssigkeit angesehen werden.**

### **1.3 Veränderung der Killer-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptor-Expression auf synovialen NK-Zellen**

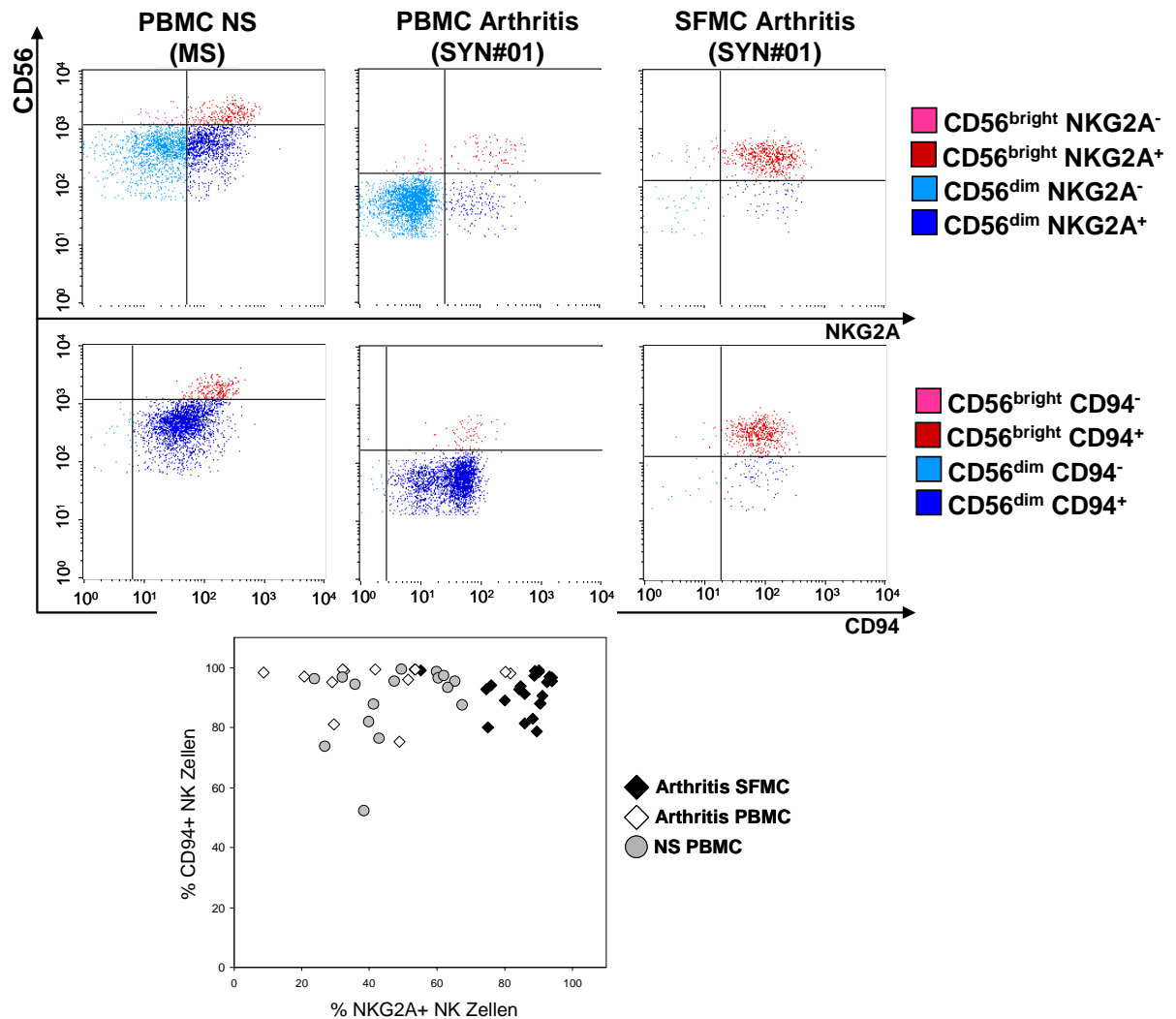
Es ist bekannt, dass die Expression von aktivierenden und inhibierenden KIR-Rezeptoren auf NK-Zellen mit der CD16-Expression korreliert, also KIR nur auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zu finden sind (Moretta, Bottino et al. 1990). Um die KIR-Expression auf synovialen NK-Zellen im Vergleich zu peripheren NK-Zellen zu untersuchen, wurden PBMC und SFMC durchflusszytometrisch auch bezüglich dieser Oberflächenexpression untersucht. Von jedem KIR existiert eine inhibierende und aktivierende Isoform vor, welche identische extrazelluläre Domänen besitzen und sich nur in ihrem Transmembranteil und der zytoplasmatischen Domäne unterscheiden. Mit den KIR-spezifischen Antikörpern kann also zwischen den inhibierenden und den aktivierenden Isoformen nicht unterschieden werden. Der Antikörper p58.1 erkennt den inhibierenden KIR2DL1 und den aktivierenden KIR2DS1, der p58.2-Antikörper bindet KIR2DL2 und KIR2DS2. Der p70-Antikörper erkennt allerdings nur KIR3DL1 und der p50.3-Antikörper bindet spezifisch an KIR2DS4. Die Frequenz KIR-positiver NK-Zellen kann in PBMC gesunder Spender stark variieren und resultiert aus einem im Detail noch nicht verstandenem „Lizensierungs“-Erziehungsprozess der NK-Zell-Vorläufer im Knochenmark (Anfossi, Andre et al. 2006, Raulet and Vance 2006, Yokoyama and Kim 2006). Diese Variabilität spiegelt sich auch in den Patientenkollektiven dieser Arbeit wieder (Abb. 18).



**Abb. 18 KIR-Expression auf peripheren und synovialen NK-Zellen**

Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Färbung von PBMC und SFMC mit CD56, CD16, p58.1 (KIR2DL/S1), p58.2 (KIR2DL/S2), p70 (KIR3DL1), p50.3 (KIR2DS4) und CD3 Antikörpern. Es ist jeweils ein repräsentativer Spender gezeigt: PBMC Normalspender MS, PBMC Arthritis-Patient SYN#01 und die autologen SFMC SYN#01. Die Lymphozyten wurden nach Größe und Granularität definiert und die KIR-Expression auf den CD16<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> NK-Zellen ausgewertet (CD56<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup>). In den Graphen ist die Auswertung des prozentualen Anteils der KIR<sup>+</sup> NK-Zellen bezogen auf die gesamte NK-Zellanzahl gezeigt (PBMC NS n=16, PBMC Arthritis n=14, SFMC Arthritis n=21). Die Linie markiert den Mittelwert (MW). STABWN: Standardabweichung

Abb. 18A zeigt, dass sich die KIR-Expression auf die CD16-positiven NK-Zellen beschränkt. Da die Spender immer verschiedene KIR-Genotypen besitzen (siehe Tab. 18 und Tab. 17, Anhang S.160, 161) variiert die KIR-Expression von Spender zu Spender. Im Durchschnitt exprimieren 10,3 % der CD16<sup>+</sup> NK-Zellen KIR2DLS/1, 15,7 % KIR2DL/S2, 13,8 % KIR3DL1 und 14,3 % KIR2DS4. Die hohe Standardabweichung bei KIR2DS4 kommt daher zustande, dass das Nullallel von KIR2DS4 in der Bevölkerung eine Frequenz von 84% besitzt und viele Spender KIR2DS4 somit gar nicht exprimieren können (Carrington 2003). Nachdem sich die Frequenz der CD16 positiven NK-Zellen im Blut von Arthritis-Patienten nicht verändert (Abb. 17C) findet hier auch keine Änderung der KIR-Expression statt (Abb. 18B). In der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten liegen signifikant weniger CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen vor ( $p < 0,001$ , Abb. 17D) als in der Peripherie der Patienten. Dementsprechend verringert sich die KIR-Expression signifikant (Abb. 18C, KIR2DL/S1  $p = 0,003$ , KIR2DL/S2  $p < 0,001$ , KIR3DL1  $p = 0,004$ , KIR2DS4  $p = 0,13$ ). Die Patienten, welche das Nullallel von KIR2DS4 besitzen können natürlich keine Änderung in der KIR2DS4-Expression zeigen. Die vollständigen Typisierungslisten der Normalspender und Patienten sind in Tab. 17 und Tab. 18 (Anhang S. S.160, 161) gezeigt. Die synovialen NK-Zellen der Arthrose-Patienten konnten phänotypisch nicht auf KIR-Expression untersucht werden, da zu wenig SFMC vorlagen. Die Frequenzen der KIR-Expression entsprechen aber auf peripheren NK-Zellen von Arthrose-Patienten denen von Arthritis-Patienten (Daten nicht gezeigt). Durch ihren synovialen KIR-negativen Phänotyp können NK-Zellen nicht über die Interaktion mit HLA-C- oder Bw4-Molekülen reguliert werden. Für die inhibitorische Funktion müssen synovialen NK-Zellen also andere Rezeptoren zur Verfügung stehen, weshalb die wichtigsten NK-Rezeptoren untersucht wurden. Der inhibierende C-Typ-Lektin Rezeptor NKG2A liegt immer als Heterodimer mit CD94 vor, wird jedoch nur auf einem Teil der NK-Zellen exprimiert und erkennt das nicht klassische HLA-E-Molekül. CD94 wird von allen NK-Zellen exprimiert und kann auch als Heterodimer mit dem aktivierenden NKG2C-Rezeptor vorliegen.

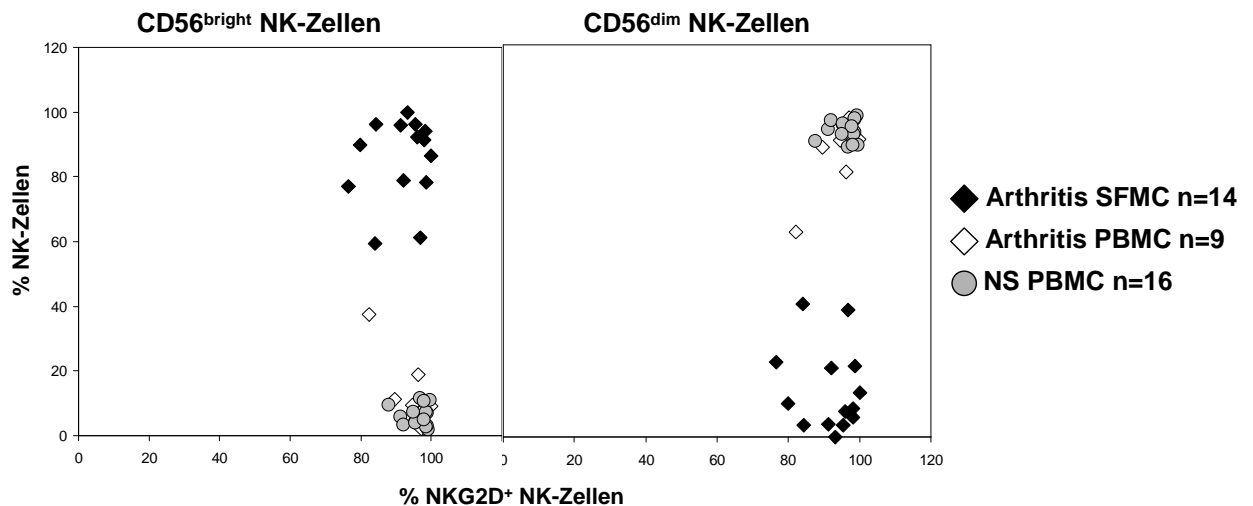


**Abb. 19 CD94- und NKG2A-Expression auf peripheren und synovialen NK-Zellen**

Dargestellt ist eine exemplarische durchflusszytometrische Färbung von PBMC und SFMC mit CD56, CD94, NKG2A und CD3 Antikörpern. Es ist jeweils ein repräsentativer Spender gezeigt: PBMC Normalspender MS, Arthritis-Patient SYN#01 (PBMC und autologe SFMC). **A.** Die Lymphozyten wurden nach Größe und Granularität definiert und die CD94 und NKG2A-Expression auf den CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen mittels der Booleschen Methode ausgewertet **B.** Der Graph zeigt die kombinierte Auswertung des prozentualen Anteils der CD94<sup>+</sup> und NKG2A<sup>+</sup> NK-Zellen bezogen auf die gesamte NK-Zellanzahl (PBMC NS n=16, PBMC Arthritis n=13, SFMC Arthritis n=22).

Abb. 19 zeigt, dass der prozentuale Anteil der CD94<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup> NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten im Vergleich zur Peripherie stark erhöht ist. 86,8±8,4 % der synovialen NK-Zellen von Arthritis-Patienten exprimieren NKG2A, aber nur 42,6±18,7 % der autologen peripheren NK-Zellen sind NKG2A positiv, was der Frequenz von Normalspendern (50,0±14,9 %) entspricht. Da CD94 auf nahezu allen NK-Zellen konstant exprimiert wird, kann die Zunahme der NKG2A-positiven NK-Zellen mit einer Abnahme von NKG2C<sup>+</sup> NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit einhergehen. Die NKG2C-Expression auf synovialen NK-Zellen konnte jedoch nicht untersucht werden, da zu Beginn der Arbeiten mit Patientenmaterial kein direkt markierter NKG2C-Antikörper vorlag und sich die Isolation von NK-Zellen aus den SFMC sehr schwierig gestaltete. Auf NK-Zellen stehen inhibierende

Rezeptoren immer in einem Gleichgewicht mit aktivierenden Rezeptoren. Ein wichtiger aktivierender Rezeptor, welcher auf allen NK-Zellen exprimiert wird, stellt NKG2D dar, dem eine Rolle bei der Rheumatoiden Arthritis in der Literatur bereits zugeschrieben wurde (Groh, Bruhl et al. 2003).



**Abb. 20** NKG2D-Expression auf peripheren und synovialen CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen

Die PBMC und SFMC wurden mit dem NKG2D-spezifischen Antikörper in Kombination mit CD56, CD16 und CD3 Antikörpern gefärbt. Die Lymphozyten wurden nach Größe und Granularität definiert und auf die CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen gated. Die NKG2D-Expression wurde auf CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen ausgewertet. Die Graphen zeigen die kombinierte Auswertung des prozentualen Anteils der NKG2D<sup>+</sup> und der CD56<sup>dim</sup>/CD56<sup>bright</sup>-Expression bezogen auf die gesamte NK-Zellanzahl.

Abb. 20 zeigt in der Tat, dass NKG2D auf nahezu allen NK-Zellen vorhanden ist und daher die Expression mit der Verschiebung der NK-Zellpopulationen in der Synovialflüssigkeit einhergeht. In der Peripherie überwiegen sowohl bei Normal Spendern ( $89,2 \pm 4,8$  %) als auch bei Arthritis-Patienten ( $84,2 \pm 9,9$  %) die NKG2D<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> Zellen, wohingegen in der Synovialflüssigkeit  $82,2 \pm 14,4$  % der NK-Zellen CD56<sup>bright</sup> NKG2D exprimieren.

Als weitere NK-Zellrezeptoren wurde die Expression der NCR (*Natural Cytotoxicity Receptors*) NKp30, NKp44 und NKp46 analysiert, wobei NKp30 und NKp46 die besten NK-spezifischen Rezeptoren darstellen und auf allen NK-Zellen exprimiert sind. Auch in den untersuchten Normalspender- und Patientenkollektiven wurden 100% der NK-Zellen als NKp30 und NKp46 positiv bewertet. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt, wobei die Expressionsdichte in die Bewertung einging.



	- keine Expression		(+ ) schwache Expression		+ hohe Expression		++ sehr hohe Expression	
	PBMC NS		PBMC Arthritis		SFMC Arthritis			
	CD56 <sup>dim</sup>	CD56 <sup>bright</sup>	CD56 <sup>dim</sup>	CD56 <sup>bright</sup>	CD56 <sup>dim</sup>	CD56 <sup>bright</sup>		
NKp30	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-		
NKp44	-	-	-	-	-	-		
NKp46	(+)	++	(+)	++	(+)	++		

**Tab. 13 Expression der NCR auf peripheren und synovialen NK-Zellen**

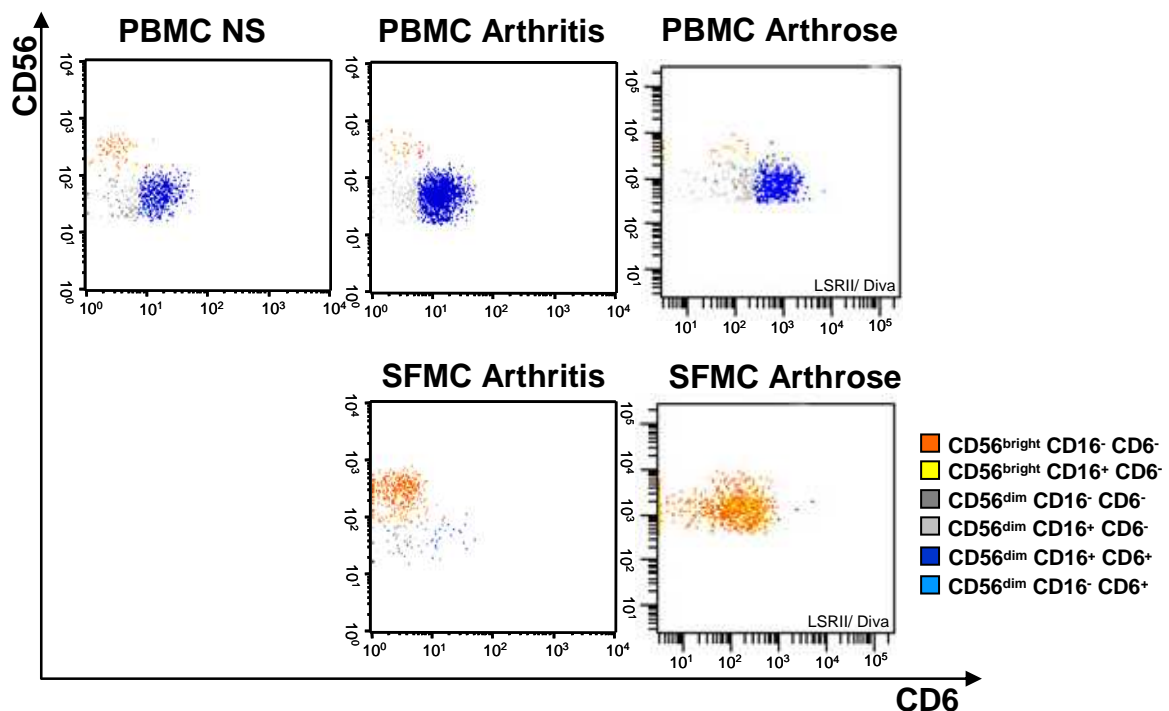
Die PBMC und SFMC wurden mit dem NCR-spezifischen Antikörper NKp30, NKp44 und NKp46 jeweils in Kombination mit CD56, CD16 und CD3 Antikörpern gefärbt. Die Lymphozyten wurden nach Größe und Granularität definiert und auf die CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> NK-Zellen gegatet. Die NCR-Expression wurde auf CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen ausgewertet. Dargestellt ist die Expressionsdichte, wobei zwischen sehr hoch ++, hoch +, schwach (+) und negativ – unterschieden wurde.

Auf peripheren NK-Zellen von Normalspendern und Arthritis-Patienten wird NKp30 generell schwach exprimiert, auf den synovialen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen konnte NKp30 nicht nachgewiesen werden. Da NKp44 auf NK-Zellen nur nach Aktivierung induziert wird (Vitale, Bottino et al. 1998), war auf den peripheren NK-Zellen der hier untersuchten Normalspender und Patienten keine NKp44-Expression nachweisbar. NKp44 konnte nicht auf synovialen NK-Zellen nachgewiesen werden, obwohl schon publiziert wurde, dass es sich hierbei um einen aktivierten Phänotyp handelt (de Matos, Berg et al. 2007). Sivori et al haben bereits beschrieben, dass NKp46 auf NK-Zellen unterschiedlich exprimiert sein kann. Bei manchen Individuen sind alle NK-Zellen homogen NKp46<sup>bright</sup>, bei anderen Individuen existiert neben diesen Zellen noch eine NKp46<sup>low</sup> Population (Sivori, Pende et al. 1999). Die Dichte der NKp46-Expression korreliert dabei mit der lytischen Aktivität. Bei den hier untersuchten Spendern und Patienten, war NKp46 ebenfalls heterogen exprimiert: CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen waren NKp46<sup>low</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen entsprechend NKp46<sup>bright</sup>. In dieser Arbeit konnte also bestätigt werden, dass die Anreicherung der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten mit der Anreicherung von NKp46<sup>bright</sup> NK-Zellen einhergeht.

**Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich das Repertoire der inhibitorischen KIR sowie der aktivierenden NKG2/NCR-Rezeptoren auf synovialen NK-Zellen entsprechend der Anreicherung der CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> Population verändert. Daher exprimieren synoviale NK-Zellen keine KIR-Rezeptoren, dafür verstärkt NKG2A/CD94 und NKG2D. Synoviale NK-Zellen scheinen deshalb nicht durch die KIR-Liganden HLA-C und HLA-Bw4 reguliert zu sein, sondern möglicherweise durch die Interaktion mit dem NKG2A/CD94-Liganden HLA-E. Die synovialen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimierten interessanterweise weder NKp30 noch NKp44, dafür aber verstärkt NKp46. Der Phänotyp der synovialen NK-Zellen kann als CD56<sup>bright</sup> NKp46<sup>bright</sup>CD94<sup>bright</sup> NKG2A<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> beschrieben werden.**

## 1.4 Korrelation der Infiltration mit CD6

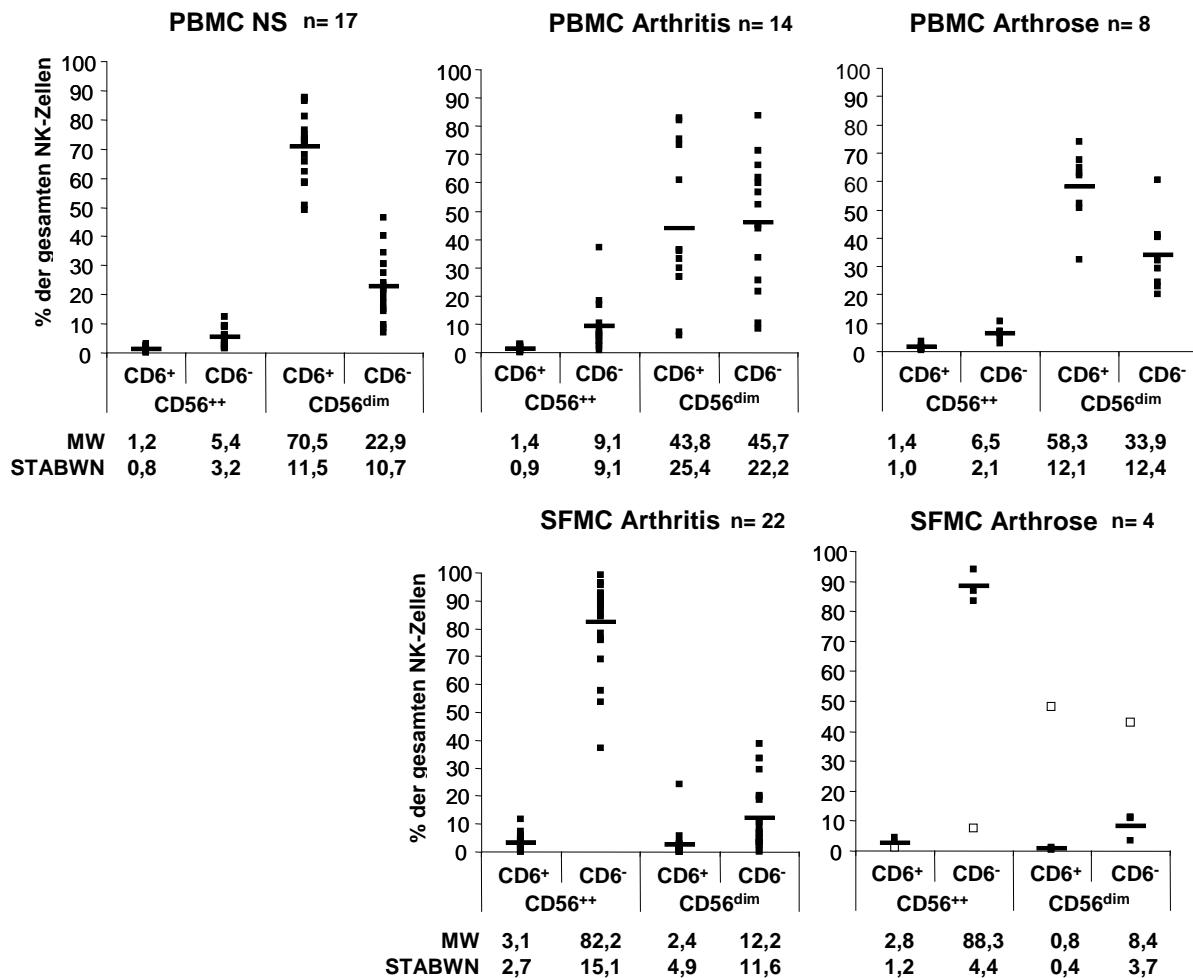
Neben den schon beschriebenen Oberflächenmarkern, wurde auch die CD6-Expression auf synovialen NK-Zellen untersucht, da CD6 in unserer Arbeitsgruppe als differentieller NK-Marker identifiziert wurde. Bisher konnte in der Literatur gezeigt werden, dass CD6-mRNS in peripheren  $CD56^{dim}$  NK-Zellen, nicht jedoch in  $CD56^{bright}$  NK-Zellen nachweisbar ist (Koopman, Kopcow et al. 2003). Die Expression des CD6-Moleküls auf der Oberfläche von NK-Zellen wurde nur in einer Publikation gezeigt, aber nicht näher analysiert (Zimmerman, Joosten et al. 2006).



**Abb. 21 CD6-Expression auf peripheren NK-Zellen von Normalspendern, Arthritis- und Arthrose-Patienten**  
Exemplarische Färbung von PBMC eines Normalspenders und eines Arthritis- bzw. Arthrose-Patienten mit CD56, CD16, CD6 und CD3 Antikörpern. Gegatet auf  $CD56^+CD3^+$  NK-Zellen. Analyse der CD6-Expression auf NK-Zellen mittels der Booleschen Auswertung. Die Arthrose-Patienten wurden immer am LSRII Durchflusszytometer gemessen und mit der Diva Software ausgewertet. Daher kann sich die Darstellung von den Messungen und Auswertungen, die mit dem Calibur Durchflusszytometer und der CellQuest Software durchgeführt wurden, unterscheiden.

In Abb. 21 sieht man deutlich, dass sich die peripheren NK-Zellen hinsichtlich ihrer CD6-Expression unterscheiden und in zwei Subpopulationen einteilen lassen. Bei Normalspendern exprimiert die Mehrheit der  $CD56^{dim}CD16^+$  NK-Zellen CD6 deutlich auf ihrer Oberfläche (dunkelblau). Die  $CD56^{bright}$  NK-Zellen sind hingegen CD6-negativ (Abb. 21), unabhängig davon ob sie CD16 exprimieren oder nicht ( $CD16^+$  gelb und  $CD16^-$  orange). Durch die Farbgebung ist deutlich zu erkennen, dass in den Synovialflüssigkeiten beider Patientengruppen die CD6-positiven NK-Zellen (hell- und dunkelblau) nahezu vollständig fehlen. In Abb. 22 sind die durchflusszytometrischen Ergebnisse zur CD6-Expression auf

NK-Zellen von allen untersuchten Normalspendern und Patienten zusammengefasst und graphisch dargestellt.



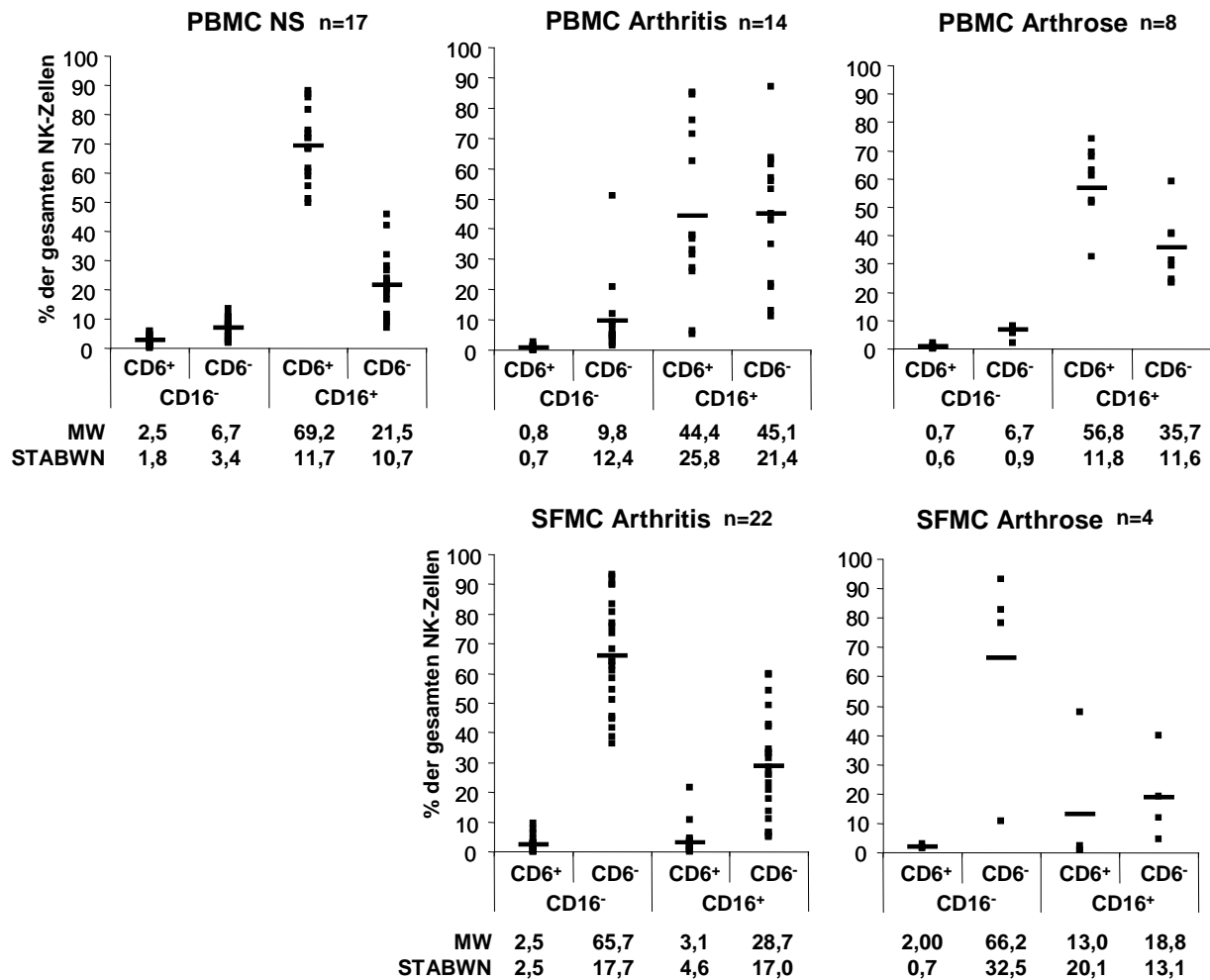
**Abb. 22** CD6-Expression auf CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen von Normalspendern, Arthritis- und Arthrose-Patienten

Durchflusszytometrische Färbung mit CD56, CD6 und CD3 Antikörpern von PBMC und SFMC von Normalspendern, Arthritis- und Arthrose-Patienten. Für die Auswertung wurden die Lymphozyten nach Größe und Granularität definiert und die CD6-Expression auf den CD56<sup>dim</sup>CD3<sup>+</sup> NK-Zellen untersucht. Einteilung in CD6<sup>+</sup> im Vergleich zu CD6<sup>-</sup> CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. Dargestellt ist die Auswertung des prozentualen Anteils bezogen auf die gesamte NK-Zellanzahl. PBMC Normalspender, n=17, PBMC Arthritis-Patienten, n=14, PBMC Arthrose-Patienten, n=8, SFMC Arthritis-Patienten, n=22, SFMC Arthrose-Patienten, n=4 mit einem „Ausreißer“ (□). Die Linie markiert den Mittelwert. STABWN: Standardabweichung

Abb. 22 zeigt, dass bei Normalspendern 70,5 % NK-Zellen CD56<sup>dim</sup>CD6<sup>+</sup> und 22,9 % NK-Zellen CD56<sup>dim</sup>CD6<sup>-</sup> sind, wohingegen 5,4 % NK-Zellen CD56<sup>bright</sup>CD6<sup>-</sup> und nur 1,2 % CD56<sup>bright</sup>CD6<sup>+</sup> sind. Bei Arthritis-Patienten ist die CD6-Expression auf peripheren CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen bereits signifikant geringer (p=0,01), da hier nur 43,8 % NK-Zellen den CD56<sup>dim</sup>CD6<sup>+</sup> Phänotyp aufweisen. Es exprimieren somit deutlich weniger CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen den CD6-Marker als bei Normalspendern. Die fehlende CD6-Expression auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen ändert sich jedoch nicht (p=0,6). Bei Arthrose-Patienten zeigen sich die gleichen Tendenzen, wobei auch hier 58,3 % der peripheren NK-Zellen CD56<sup>dim</sup>CD6<sup>+</sup> sind,

was im Vergleich zu den Normalspendern einer signifikanten Abnahme ( $p=0,05$ ) entspricht. Betrachtet man nun die SFMC der Arthritis-Patienten, fällt auf, dass die CD6-Expression auf allen NK-Zellen, unabhängig davon, ob sie CD56<sup>bright</sup> oder CD56<sup>dim</sup> sind, fast vollständig verschwunden ist. Im Vergleich zu den autologen PBMC der Patienten liegen in der Synovialflüssigkeit signifikant weniger CD56<sup>dim</sup>CD6<sup>+</sup> NK-Zellen vor (2,4 %,  $p<0,001$ ), es ist also nur noch eine kleine Fraktion CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen CD6-positiv. Auch in der CD56<sup>bright</sup> Fraktion sind nur wenige NK-Zellen CD6-positiv (3,1 %). Die größte Zellfraktion in der Synovialflüssigkeit stellen somit die CD56<sup>bright</sup> CD6<sup>-</sup> NK-Zellen dar (82,2 %). Im Vergleich zu den autologen PBMC ist diese Fraktion in der Synovialflüssigkeit hochsignifikant erhöht ( $p<0,001$ ). Vernachlässigt man den Ausreißer ( $\square$ ) bei den SFMC der Arthrose-Patienten, so sieht man hier ebenfalls die Dominanz der CD6-negativen NK-Zellen (CD56<sup>bright</sup> 88,3 %, CD56<sup>dim</sup> 8,4 % der NK-Zellen) gegenüber den CD6-positiven NK-Zellen. Die Fraktion der CD56<sup>bright</sup> CD6<sup>-</sup> NK-Zellen ist im Vergleich zu den autologen PBMC ebenfalls signifikant erhöht ( $p=0,01$ ). Auch hier fehlt auf den NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit der CD6-Marker ( $p=0,01$ ). Die Verteilung des CD6 Moleküls auf peripheren NK-Zellen von Arthritis und Arthrose-Patienten stellt eine Art „Zwischenzustand“ zwischen den PBMC von Normalspendern und den SFMC dar. Somit könnte die Veränderung der CD6-Expression in der Peripherie der Patienten bereits einen Hinweis auf eine inflammatorische Erkrankung geben. Bei nicht autoimmunen Arthrose-Patienten ist der Unterschied der CD56<sup>dim</sup>CD6<sup>+</sup> NK-Zellpopulation im Vergleich zu den Normalspendern nicht so groß ( $p=0,05$ ) wie bei den autoimmunen Arthritis-Patienten ( $P=0,01$ ). Dieser Befund könnte einen Hinweis auf die stärkere Entzündungsreaktion bei autoimmunen Patienten darstellen. Diese Vermutung konnte durch die Untersuchung von PBMC von Psoriasis vulgaris-Patienten (siehe Abb. 38, S.101) untermauert werden, da hier die Frequenz der CD56<sup>dim</sup>CD6<sup>+</sup> NK-Zellen im Vergleich zu Normalspendern ebenfalls abnimmt und den Werten der Arthrose-Patienten entspricht. Bei Psoriasis vulgaris wurde ebenfalls eine Anhäufung von CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> Zellen im Gewebe (Haut) beschrieben (Ottaviani, Nasorri et al. 2006), was einen weiteren Überschneidungspunkt mit den Arthritis- und Arthrose-Patienten liefert.

Da die CD56<sup>dim</sup>-NK-Population mit der CD16-Expression assoziiert ist, liegt die Annahme einer starken CD6-Expression nahe, weshalb nach der booleschen Logik die CD6- mit der CD16-Expression kombiniert analysiert wurde (Abb. 23).



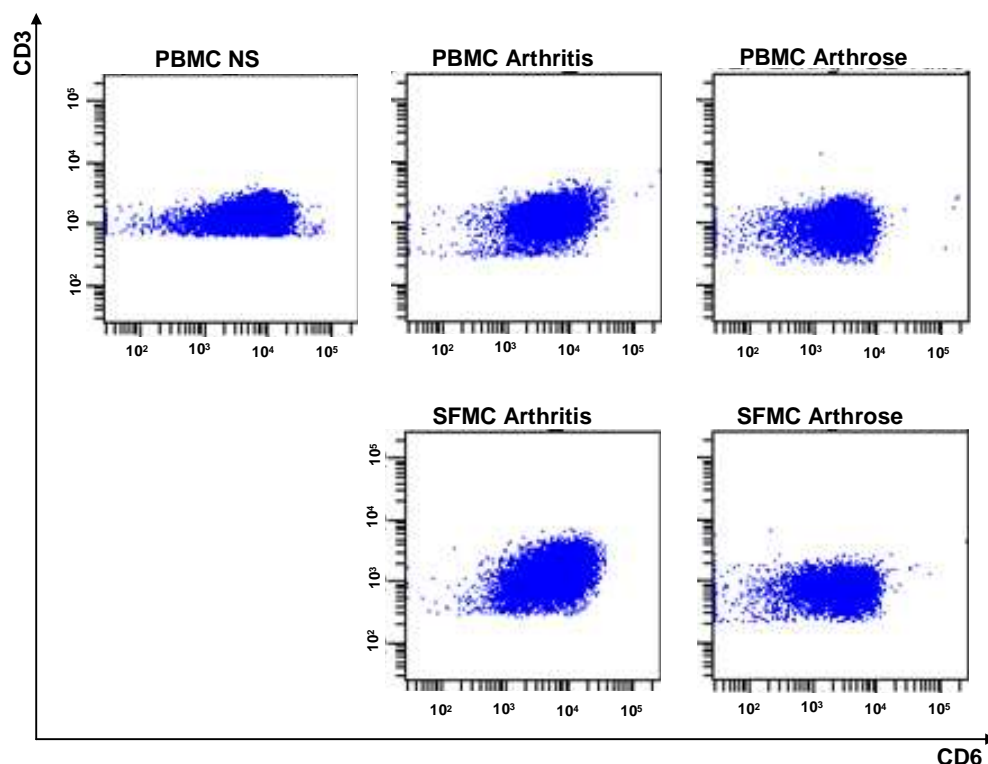
**Abb. 23** CD6-Expression auf CD16<sup>-</sup> und CD16<sup>+</sup> peripheren und synovialen NK-Zellen von Normalspendern, Arthritis- und Arthrose-Patienten

Durchflusszytometrische Färbung mit CD56, CD6, CD16 und CD3 Antikörpern von PBMC und SFMC von Normalspendern, Arthritis- und Arthrose-Patienten. Für die Auswertung wurden die Lymphozyten nach Größe und Granularität definiert und die CD6- und CD16-Expression auf den CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> NK-Zellen untersucht. Einteilung in CD6<sup>+</sup> im Vergleich zu CD6<sup>-</sup> auf CD16<sup>+</sup> und CD16<sup>-</sup> NK-Zellen. Dargestellt ist die Auswertung des prozentualen Anteils bezogen auf die gesamten NK-Zellen. PBMC Normalspender, n=17, PBMC Arthritis-Patienten, n=14, PBMC Arthrose-Patienten, n=8, SFMC Arthritis-Patienten, n=22, SFMC Arthrose-Patienten, n=4 mit einem „Ausreißer“ (□). Die Linie markiert den Mittelwert. STABWN: Standardabweichung

Analog zu der Korrelation des CD6-Markers mit CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (Abb. 22), ist die Mehrzahl der CD16<sup>+</sup> NK-Zellen im Blut auch positiv für CD6 (69,2 %), wobei kein signifikanter Unterschied zwischen PBMC von Normalspendern und Arthrose-Patienten zu sehen war. Bei Arthritis-Patienten ist die Anzahl der CD16<sup>+</sup>CD6<sup>+</sup> NK-Zellen im Blut (44,4 %) im Vergleich zu Normalspendern jedoch signifikant verringert (p=0,01). Entsprechend der Anreicherung der CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen, ist in der Synovialflüssigkeit der Anteil der CD16<sup>-</sup>CD6<sup>-</sup> NK-Zellen bei Arthritis- und Arthrose-Patienten im Vergleich zu den autologen PBMC signifikant erhöht (SFMC Arthritis 65,7 %, p<0,001, SFMC Arthrose 66,2 %, p=0,007). Interessanterweise weisen die verbleibenden CD16<sup>+</sup> NK-Zellen ebenfalls einen

CD6-negativen Phänotyp auf (Arthritis 28,7 %, Arthrose 18,8 %), wobei diese Änderung im Vergleich zu den autologen PBMC signifikant ist (Arthritis  $p=0,02$ , Arthrose  $p=0,01$  ohne  $\square$ ).

Da CD6 bekanntermaßen am stärksten auf allen T-Lymphozyten exprimiert wird (Mayer, Funke et al. 1990, Gimferrer, Calvo et al. 2004, Gimferrer, Ibanez et al. 2005), wurde untersucht, ob auch das T-Zellinfiltrat in der Synovialflüssigkeit durch das Fehlen des CD6-Markers charakterisiert war.



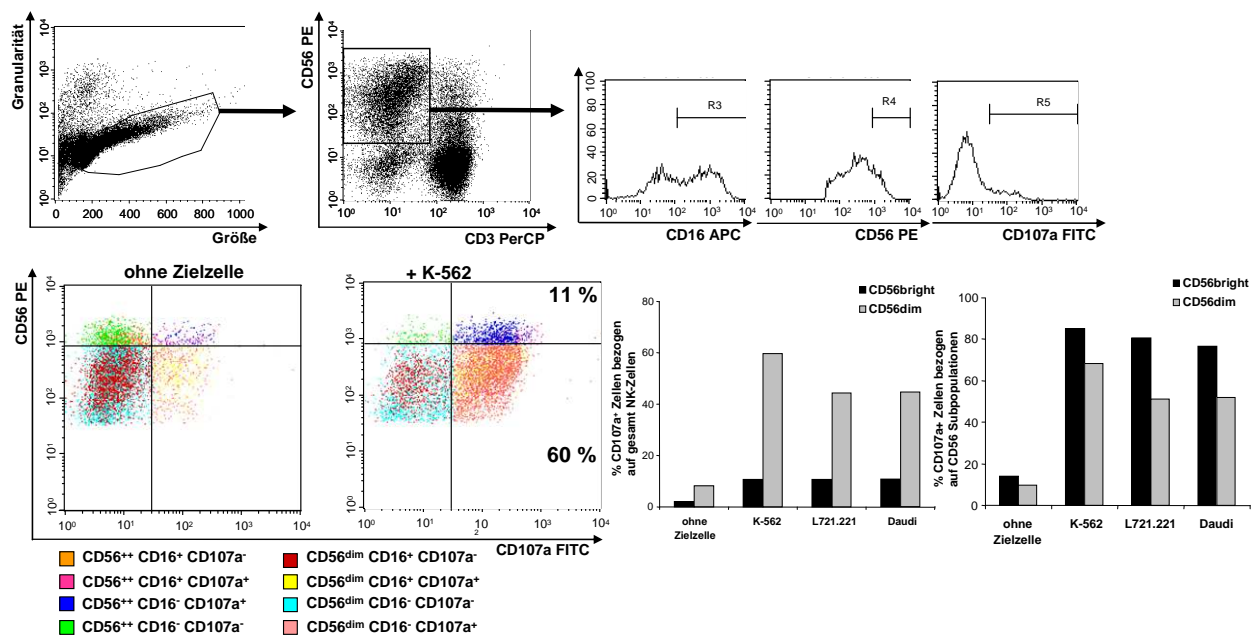
**Abb. 24 CD6-Expression auf T-Zellen eines Normalspenders, eines Arthritis- und eines Arthrose-Patienten**  
Dargestellt ist eine exemplarische FACS-Färbung mit CD3 und CD6 Antikörpern von PBMC eines Normalspenders, eines Arthritis- und eines Arthrose-Patienten. Im Vergleich dazu sind die SFMC der gleichen Arthritis- und Arthrose-Patienten gezeigt. Es wurde auf die CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten gegatet und die CD6-Expression der T-Zellen dargestellt.

Im Gegensatz zu den NK-Zellen wiesen sowohl die peripheren T-Zellen von Normal Spendern, als auch die der Arthritis-Patienten eine hohe CD6-Expression auf. In Abb. 24 ist exemplarisch jeweils nur ein Patient dargestellt, diese Beobachtung wurde jedoch bei allen untersuchten Patienten, unabhängig von der Erkrankung gemacht. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass CD6 auf NK-Zellen eine andere Funktion als auf T-Lymphozyten ausübt und somit einen nur für NK-Zellen spezifischen Infiltrationsmarker darstellt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CD6 NK-Zellen in zwei Subpopulationen unterteilt und so neben CD16 einen differentiellen Marker auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen darstellt. Die Analyse der CD6-Expression zeigt, dass dieser Marker wesentlich besser für die Charakterisierung der synovialen NK-Zellen geeignet ist, als die Einteilung durch CD56 und CD16. In der Synovialflüssigkeit zeichnen sich die NK-Zellen durch das Fehlen des CD6-Markers aus, unabhängig davon, ob es sich um CD56<sup>dim</sup> oder CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen handelt. Die Abwesenheit von CD6 korreliert also mit der Infiltration der NK-Zellen in die Synovialflüssigkeit. Darüber hinaus ist eine Verschiebung des peripheren NK-Zellrepertoires bei Patienten zu beobachten, welche sich bei autoimmunen Arthritis-Patienten stärker bemerkbar macht, als bei Arthrose-Patienten. Da diese Veränderung durch die alleinige Betrachtung von CD56 und CD16 nicht zu erkennen ist, stellt CD6 nicht nur einen differentiellen Marker auf NK-Zellen dar, sondern seine Expression bedeutet eine Art „Ausschlusskriterium“ für die NK-Zellinfiltration in die Synovialflüssigkeit. Die präzise Beschreibung des Phänotyps der synovialen NK-Zellen kann also auf CD6<sup>-</sup> CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> CD94<sup>bright</sup> NKp46<sup>bright</sup> NKG2A<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> erweitert werden.

## 2 Zytotoxische Funktion der synovialen NK-Zellen

In der Literatur wird den beiden peripheren NK-Zellpopulationen eine unterschiedliche Aktivität bezüglich der Effektorfunktionen Zytotoxizität und Zytokinfreisetzung zugeschrieben. Dabei wird die zytotoxische Eigenschaft den  $CD16^+CD56^{dim}$  NK-Zellen und die Zytokinfreisetzung den  $CD16^-CD56^{bright}$  NK-Zellen zugeschrieben, die hauptsächlich auf die „Signatur“-Zytokine  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  und die Chemokine IL-8 (CXCL8) und MIP-1 $\beta$  (CCL13) beruht. Die Zytotoxizität der verschiedenen NK-Zellen wurde mittels CD107a-Degranulationsversuchen bestimmt, da man bei dieser Methode heterogene Effektorpopulationen, also die verschiedenen NK-Zell-Subpopulationen in ihrer Funktionalität auf Einzelzellniveau unterscheiden kann. Die Degranulationsversuche wurden wie auf S. 50 (Methoden, 5.) beschrieben durchgeführt. In Abb. 25 ist die Auswertung der CD107a-Degranulation nach der Booleschen Methode beschrieben.



**Abb. 25** Auswertestrategie für CD107a-Degranulationsversuche nach „Boole“

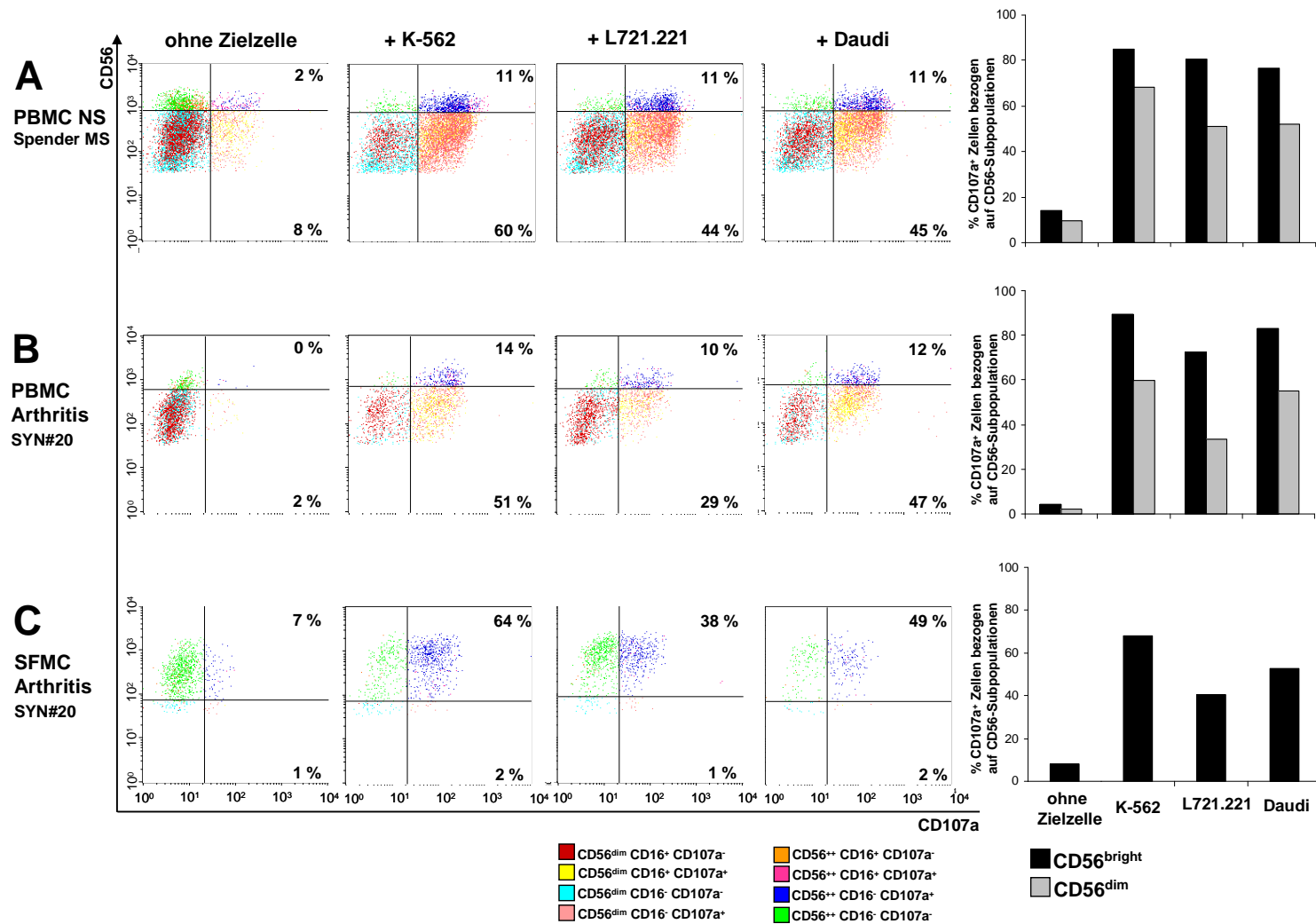
Exemplarisch gezeigt ist die Färbung von PBMC eines Normalspenders mit CD107a FITC, CD56 PE, CD3 PerCP und CD16 APC Antikörpern. Das Gate wird für aktivierte Lymphozyten nach Größe und Granularität gelegt und anschließend auf  $CD56^+CD3^+$  NK-Zellen gegatet. Über die Histogramme der jeweiligen Fluoreszenz werden die verschiedenen Marker als positiv bzw. negativ definiert (z.B. R3 =  $CD16^+$ , nicht R3 =  $CD16^-$ ). Über die boolesche Logik werden die Marker R3, R4 und R5 miteinander kombiniert und farblich markiert. Graphisch dargestellt ist der prozentuale Anteil an CD107a-positiven Zellen bezogen auf die gesamten NK-Zellen (11%  $CD107a^+CD56^{bright}$  NK-Zellen und 60 %  $CD107a^+CD56^{dim}$  NK-Zellen nach Inkubation mit K-562, linker Graph) bzw. der prozentuale Anteil der CD107a-positiven Zellen bezogen auf die  $CD56^{bright}$  und  $CD56^{dim}$  Subpopulationen (rechter Graph).



Die IL-2 aktivierten PBMC (48 Stunden, 500 U IL-2/ ml) wurden nach der 4-stündigen Inkubation mit den Zielzellen und dem CD107a Antikörper mit CD56, CD16, CD6 und CD3 Antikörpern nachgefärbt. Für die Auswertung wurden zunächst die aktivierten Lymphozyten über die Größe und Granularität ausgewählt. Anschließend wurde auf die CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK-Zellen gegatet. Von den NK-Zellen wurden dann die Histogramme der Fluoreszenzen angezeigt. Über drei Regionen R3, R4 und R5 wurden die jeweiligen Marker als positiv definiert. Die Ereignisse die nicht in diesen Regionen liegen stellen die, für den jeweiligen Marker, negativen Zellen dar. Durch boolesche Mathematik wurden dann die Regionen in verschiedenen Kombinationen miteinander verknüpft und durch einen Farbcode markiert (siehe auch S.48, Methoden 4.4). Lässt man sich CD56 gegen CD107a in einem Dot Plot anzeigen, so kann man über den Farbcode und die dazu angezeigte Statistik gut die degranulierenden, also CD107a-positiven Zellen erkennen und mit der spontanen Degranulation ohne Zielzelle vergleichen. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse kann man entweder den prozentualen Anteil der CD107a-positiven NK-Zellen an der Anzahl der gesamt NK-Zellen angeben oder den prozentualen Anteil der CD107a-positiven NK-Zellen auf die zwei NK-Zell-Subpopulationen beziehen. Da bei Normalspendern die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen die Mehrheit der NK-Zellen repräsentieren, ergibt sich in der ersten Darstellungsweise eine höhere Degranulation der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die zweite, relative Darstellungsweise gewählt, da hier zusätzlich der Anteil der jeweiligen Subpopulation an der Gesamtzahl der NK-Zellen berücksichtigt wird.

## 2.1 Die zytotoxische Eigenschaft der NK-Zellen

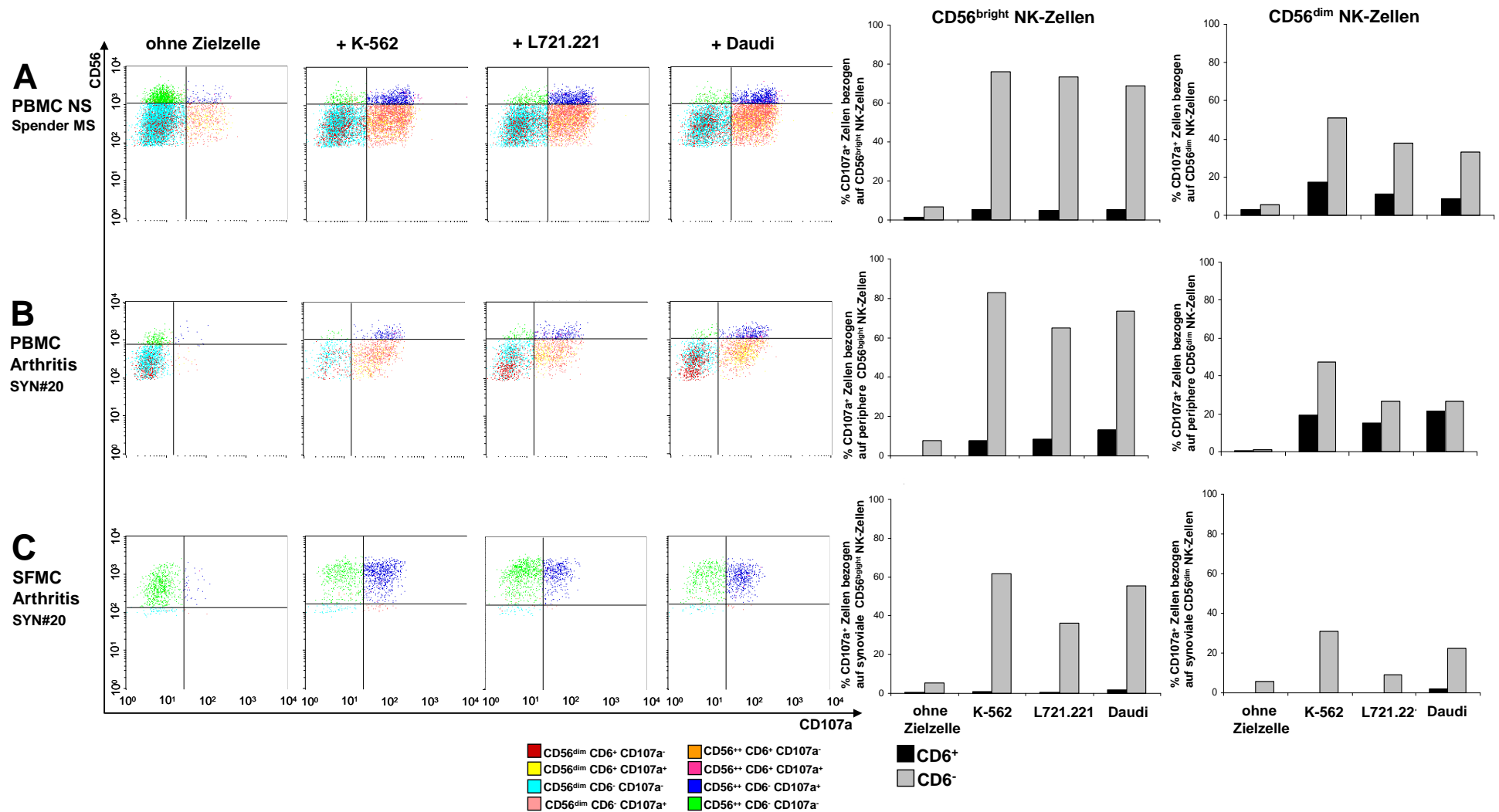
Die klare „Rollenverteilung“ der Effektorfunktionen auf die zwei NK-Zell-Subpopulationen wird mittlerweile vor allem im Gewebe immer mehr in Frage gestellt. Aus diesem Grund wurde auch in dieser Arbeit die Degranulationsfähigkeit der beiden NK-Zell-Subpopulationen untersucht. Hierfür wurden PBMC gesunder Normalspender, PBMC von Arthritis-Patienten und SFMC von Arthritis-Patienten 48 h mit IL-2 (500 U/ml) aktiviert und anschließend mit dem CD107a Antikörper und den HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen K-562, L721.221 und Daudi inkubiert. In Abb. 26 sind exemplarisch die Ergebnisse von einem dieser Degranulationsversuche dargestellt.



**Abb. 26** Degranulation der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zell-Subpopulationen aus PBMC eines Normalspenders im Vergleich mit PBMC und SFMC eines Arthritis-Patienten (SYN#20). Die PBMC und SFMC wurden 48 h mit IL-2 stimuliert (500 U/ml). Anschließend wurden sie für 4 h mit Zielzellen und dem CD107a Antikörper inkubiert. Als Kontrolle der spontanen Degranulation diente ein Ansatz ohne Zielzellen. Die Zellen wurden dann mit CD56, CD3 und CD16 Antikörpern gegengefärbt. Auswertestrategie siehe Abb. 25. **A.** PBMC Normalspender MS **B.** PBMC Arthritis-Patient SYN#20 **C.** SFMC Arthritis-Patient SYN#20

Abb. 26A zeigt exemplarisch den Degranulationsversuch mit Normalspender PBMC (Spender MS) (NK-Zellen: 15 % CD56<sup>bright</sup> und 85 % CD56<sup>dim</sup>). In der graphischen Darstellung sieht man, dass 85 % der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nach Erkennung der K-562 Zellen degranulieren, bei L721.221 degranulieren 81 % und bei Daudi 77 % der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen weisen mit 68 % nach Erkennung von K-562, 51 % bei L21.221 und 52 % bei Daudi eine etwas schwächere Degranulation auf. Alle drei Zielzellen zeigen keine Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen, exprimieren jedoch andere Liganden für NK-Adhäsionsmoleküle bzw. NK-Rezeptoren (z.B. ICAM-1, LFA-3, MICA/B, ULBP1-3) unterschiedlich stark und werden deshalb unterschiedlich gut von NK-Zellen erkannt. Die Degranulation der peripheren NK-Zellen eines Arthritis-Patienten (SYN#20) ist in Abb. 26B dargestellt. Hier degranulieren 89 % der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen gegen K-562, 72 % gegen L721.221 und 83 % gegen Daudi; 60 % der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen degranulieren gegen K-562, 33 % gegen L721.221 und 55 % gegen Daudi. Die peripheren NK-Zellen eines Arthritis-Patienten weisen also in etwa die gleiche Fähigkeit zur Degranulation auf wie periphere NK-Zellen eines Normalspenders. Diese Ergebnisse zeigen, dass CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zytotoxische Eigenschaften besitzen. Die Degranulation synovialer NK-Zellen (Arthritis-Patient SYN#20, Abb. 26C) zeigt deutlich, dass die dominierenden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen auch in diesem Kompartiment prinzipiell in der Lage sind zu degranulieren, wobei die Effizienz geringer zu sein scheint. 68 % der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen degranulieren nach Erkennung von K-562, 41 % mit L721.221 und 53 % mit Daudi Zellen. Die Degranulation der synovialen CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen wurde nicht angegeben, da bei dem hier gezeigten Patient SNY#20 nur 7 % der synovialen NK-Zellen den CD56<sup>dim</sup> Phänotyp aufweisen. Die prozentuale Auswertung der CD107a-positiven NK-Zellen verfälscht die Ergebnisse aufgrund der geringen Zellzahl und ist deshalb nicht gezeigt. Diese Degranulations-Experimente wurden mit 10 Normalspendern durchgeführt. Für die Experimente lag nur Material von 4 Arthritis-Patienten vor, da das Infiltrat meist zu wenig Leukozyten für funktionelle Untersuchungen enthielt, bzw. sich kryokonserviertes Material als unbrauchbar erwies.

Da in dieser Arbeit das CD6-Molekül als Infiltrationsmarker auf NK-Zellen identifiziert wurde, wurde im Folgenden auch die Funktionalität bezüglich der CD6<sup>+</sup> und CD6<sup>-</sup> NK-Zellpopulationen untersucht. Es konnte leider kein Vergleich mit der Degranulation der NK-Zellen von Arthrose-Patienten angestellt werden, da nicht genug Probenmaterial vorlag.



**Abb. 27 Degranulation der CD6<sup>+</sup> und CD6<sup>-</sup> NK-Zell-Subpopulationen aus PBMC eines Normalspenders im Vergleich mit PBMC und SFMC eines Arthritis-Patienten (SYN#20)**

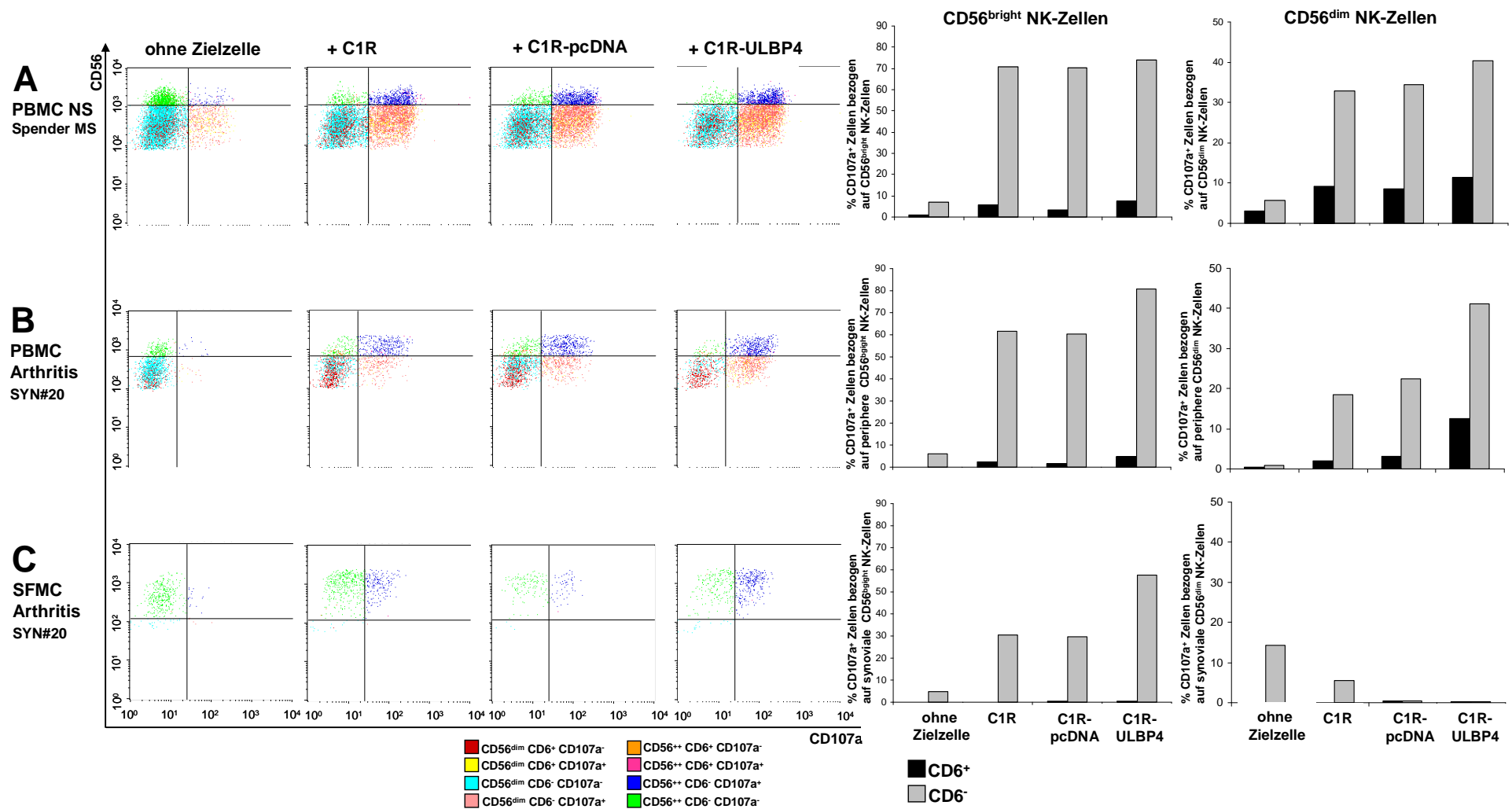
Die PBMC und SFMC wurden 48 h IL-2 stimuliert (500 U/ ml). Anschließend wurden sie für 4 h mit Zielzellen und CD107a Antikörper inkubiert. Als Kontrolle der spontanen Degranulation diente ein Ansatz ohne Zielzellen. Die Zellen wurden dann mit CD56, CD3 und CD6 Antikörpern gegengefärbt. Auswertestrategie siehe Abb. 25. **A.** PBMC Normalspender MS **B.** PBMC Arthritis-Patient SYN#20 **C.** SFMC Arthritis-Patient SYN#20

In Abb. 27A ist exemplarisch die Degranulation der CD6-negativen und CD6-positiven NK-Zellen eines Normalspenders zu sehen. Insgesamt wurden 10 Normalspender untersucht. 76 % der CD6<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen degranulieren durch die Stimulation mit K-562, 73 % mit L721.221 und 69 % mit Daudi. Nachdem alle CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen CD6 negativ sind, entsprechen diese Werte den Werten der CD16-Auswertung aus Abb. 26A. Bei diesem Spender exprimieren 66 % der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen CD6 (Vgl. mit Abb. 22), wobei diese NK-Zellen anscheinend eine geringere zytotoxische Aktivität als die CD6<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zu besitzen, da im Gegensatz zu den CD6<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (51 %) nur 17 % der CD6<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen mit K-562 degranulieren. Die peripheren NK-Zellen des Arthritis-Patienten SYN#20 entsprechen in ihrer zytotoxischen Aktivität denen des Normalspenders. In der Synovialflüssigkeit (Abb. 27C) befinden sich ausschließlich CD6<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, die mit 61 % gegen K-562 schwächer degranulieren als die autologen peripheren CD6<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (81 % gegen K-562). Die in der Synovialflüssigkeit verbliebenen CD6<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zeigen mit 31 % gegen K-562 eine schwache Degranulation, welche aufgrund der geringen Zellzahl aber nicht gewertet werden kann. Dieses Experiment wurde mit 4 Patientenproben durchgeführt, wobei sich die Ergebnisse ausgezeichnet reproduzieren ließen. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Fallzahlen verzichtet.

**Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bei Normalspendern sowohl die CD56<sup>bright</sup> als auch die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen degranulieren. Prozentual auf die Subpopulationen bezogen degranulieren sogar mehr CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen als CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Die CD6<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen degranulieren etwas stärker als CD6<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Die peripheren NK-Zellen eines Arthritis-Patienten zeigen die gleich zytotoxische Funktionalität wie die eines Normalspenders. In der Synovialflüssigkeit dominieren die CD6<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und degranulieren nach der Erkennung von K-562 etwas schwächer als die autologen peripheren NK-Zellen desselben Phänotyps.**

## **2.2 Vergleich der NKG2D-vermittelten Aktivierung zwischen synovialen und peripheren NK-Zellen**

NKG2D ist einer der wichtigsten aktivierenden NK-Rezeptoren, der im Humansystem auch konstitutiv auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, den meisten  $\gamma\delta$  T-Zellen und aktivierten Makrophagen exprimiert wird (Bauer, Groh et al. 1999, Raulet 2003). Da synoviale NK-Zellen keine aktivierenden KIR-Rezeptoren, aber vor allem den NKG2D-Rezeptor hoch exprimieren (Vgl. mit Abb. 18 und Abb. 20), wurde im Folgenden die Rolle von NKG2D für die Degranulation im Detail analysiert. Hierzu wurden als Zielzellen im Degranulationsversuch ULBP4-transfizierte C1R-Zellen verwendet, da ULBP4 (RAET1E) neben MICA, MICB und ULBP1-3 einen nur in der Haut exprimierten Liganden für den aktivierenden NK-Rezeptor NKG2D darstellt. ULBP4 wurde in den pcDNA3.1- (Labor Falk) und in den pAcGFP-Vektor kloniert und in C1R-Zellen transfiziert. Die Expression wurde mit eigens dafür hergestellten monoklonalen Antikörpern (7H2, 7H7, 8G1, 1B3 und 6F4, Ratte IgG2a, Kollaboration E. Kremmer) kontrolliert (siehe Abb. 14, Methoden S.57).



**Abb. 28 Degranulation der CD6<sup>+</sup> und CD6<sup>-</sup> NK-Zell-Subpopulationen gegen C1R-ULBP4 Transfektanten aus PBMC eines Normalspenders im Vergleich zu PBMC und SFMC eines Arthritis-Patienten (SYN#20)**

Die PBMC und SFMC wurden 48 h mit IL-2 stimuliert (500 U/ ml). Anschließend wurden sie für 4 h mit den Zielzellen und dem CD107a Antikörper inkubiert. Als Kontrolle der spontanen Degranulation diente ein Ansatz ohne Zielzellen. Die Zellen wurden dann mit CD56, CD3 und CD6 Antikörpern gegengefärbt. Auswertestrategie siehe Abb. 25. **A.** PBMC Normalspender MS **B.** PBMC Arthritis-Patient SYN#20 **C.** SFMC Arthritis-Patient SYN#20

C1R-Zellen sind nicht vollständig HLA-Klasse-I-negativ, sondern exprimieren schwach HLA-Cw\*0403 und Bw\*3501. Sie werden daher ähnlich gut wie K562-Zellen von 71 % der CD6<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen des Normalspenders MS erkannt (Abb. 28A). Der zusätzliche NKG2D-Ligand ULBP4 bewirkt keine weitere Steigerung der Degranulation im Vergleich mit der Vektorkontrolle. 34 % der CD6<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen dieses Spenders degranulieren mit C1R-pcDNA3.1, ULBP4 erhöht diese Degranulation auf 40 %, wohingegen nur 8 % der CD6<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen gegen C1R-pcDNA3.1 degranulieren und ULBP4 keine zusätzliche Aktivierung bewirken konnte (11 %). Dagegen steigert ULBP4 bei dem Arthritis-Patienten SYN#20 die Degranulation der peripheren CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen im Vergleich mit der Vektorkontrolle von 61 % auf 81 % (Abb. 28B). Auch die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen lassen sich durch ULBP4 zusätzlich aktivieren, da 41 % der CD6<sup>-</sup> (Vektorkontrolle 22 %) und 13 % der CD6<sup>+</sup> (Vektorkontrolle 3 %) CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen degranulieren. Auch die synovialen NK-Zellen lassen sich durch ULBP4 zusätzlich aktivieren, da 58 % der CD6<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen degranulieren (Abb. 28C). Da in dieser Synovialflüssigkeit kaum CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen vorhanden waren, konnte diese Subpopulation vernachlässigt werden. Das Experiment wurde insgesamt mit 4 Patientenproben und 10 Normalspendern durchgeführt.

**Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine zusätzliche NKG2D-Stimulation durch ULBP4 bei Normalspendern nur eine geringe Aktivitätssteigerung der CD6<sup>-</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen bewirkt. Bei Arthritis-Patienten werden sowohl die peripheren CD6<sup>-</sup> CD56<sup>bright</sup> als auch CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zusätzlich durch NKG2D aktiviert. Interessanterweise hat die ULBP4-vermittelte NKG2D-Bindung keine aktivierende Funktion auf die peripheren CD6<sup>+</sup> NK-Zellen. Im Gegensatz zu der postulierten Behauptung, dass der NKG2D-Rezeptor auf synovialen NK-Zellen aufgrund konstitutiver Exposition mit Liganden, z.B. MICA, nicht mehr reaktiv ist, konnte an diesen Proben eindeutig gezeigt werden, dass die synovialen CD6<sup>-</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen gut durch den NKG2D-Liganden ULBP4 aktiviert werden können.**



Anhand dieser Beispiele konnte gezeigt werden, dass sowohl synoviale CD6<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> als auch CD6<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen eine geringere Zytotoxizität aufweisen als die autologen peripheren NK-Subpopulationen. Nachdem sich aber der Phänotyp zwischen den peripheren und synovialen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nicht ändert, sondern sich diese nur in der Synovialflüssigkeit anreichern, wäre es möglich, dass das unterschiedliche Zytokin/Chemokinmilieu in der Synovialflüssigkeit Auswirkungen auf die Funktionalität der NK-Zellen besitzt. Aus diesem Grund wurden PBMC von Patienten 48 h mit 10 % der Überstände der autologen Synovialflüssigkeiten inkubiert und anschließend die Degranulation nach Erkennung von K-562, L721.221 und Daudi untersucht. Die Stimulation mit dem synovialen Zytokin/Chemokinmuster hatte keine Auswirkungen auf die Degranulation der PBMC (Daten nicht gezeigt) (Pridgeon, Lennon et al. 2003).

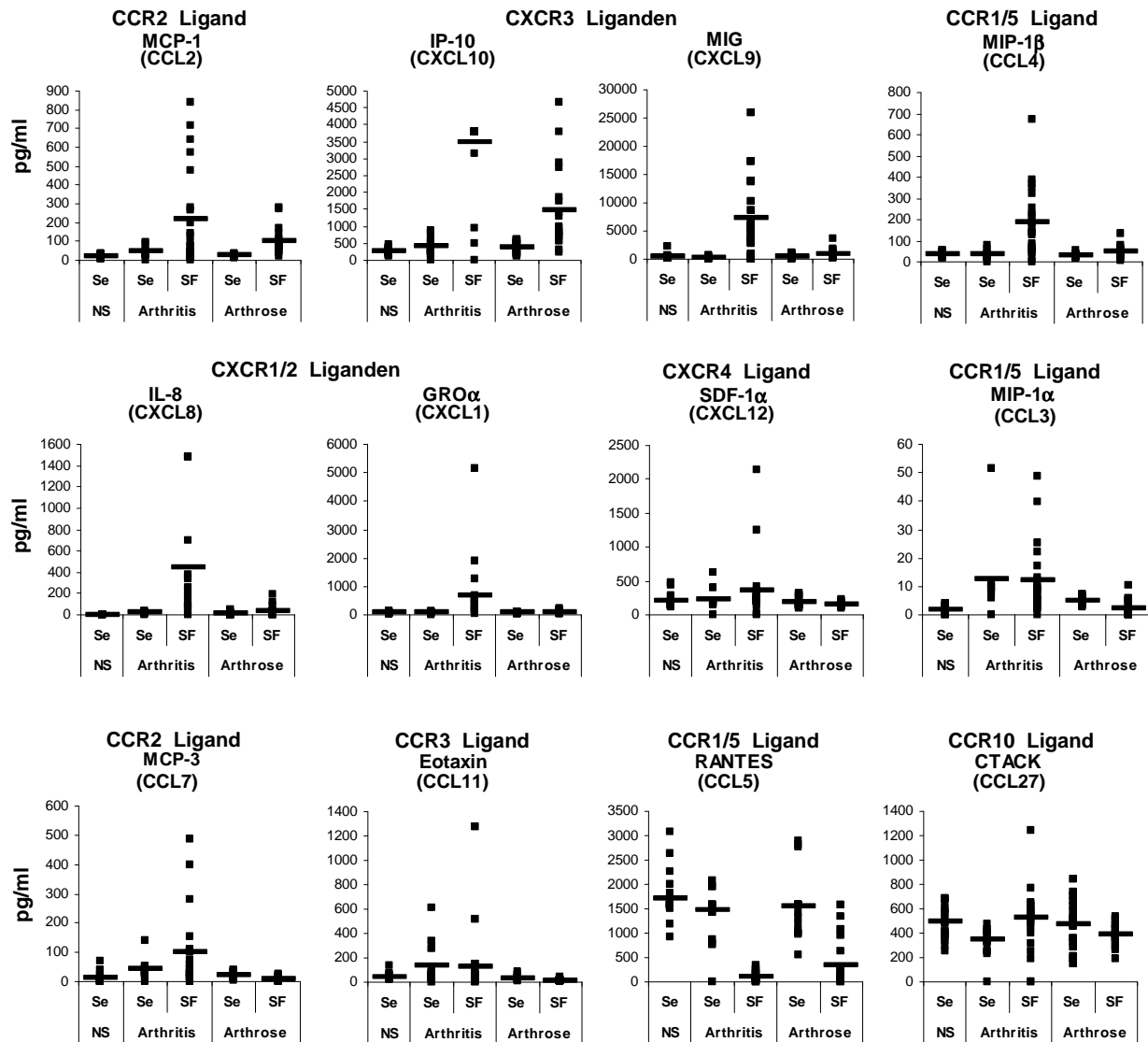
Neben der Zytotoxizität stellt die Zytokinfreisetzung die zweite Effektorfunktion der NK-Zellen dar. IFN- $\gamma$  wird in der Literatur als das „Signatur“-Zytokin der NK-Zellen beschrieben. Um das gesamte Zytokin- und Chemokinrepertoire von NK-Zellen zu untersuchen, wurden in unserer Arbeitsgruppe die NK-Zelllinien NK92, NKL und YT für 24 Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert. Die Zellen wurden dann lysiert und die Lysate in einem Multiplex-Versuch analysiert (siehe Abb. 58, Anhang S.157). Die Ergebnisse entsprechen also denen einer intrazellulären Färbung der einzelnen Analyte, da die sezernierten Moleküle nicht erfasst wurden. Dieser Versuch zeigte, dass NK-Zellen nach einer unspezifischen Stimulation kein PDGF, IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12(p70), IL-15, IL-17, Eotaxin, b-FGF, G-CSF und IL-2Ra produzieren. Die Linie NK92 produziert konstitutiv IL-8, IP-10, MCP-1 und VEGF. Nach der Stimulation konnten bei NK92 IL-10, IFN- $\gamma$ , MIP1 $\beta$  und RANTES nachgewiesen werden. Die Linie NKL produziert konstitutiv nur MIP-1 $\beta$  und RANTES, die Produktion von IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IP-10 und M-CSF konnte durch die Stimulation induziert werden. Die Linie YT produziert konstitutiv IL-10, IFN- $\gamma$ , IP-10, SDF-1 $\alpha$ , HGF und VEGF und nach Stimulation zusätzlich MIP-1 $\beta$  und RANTES. ICAM-1, MIF und GM-CSF produzieren alle drei Linien konstitutiv. Diese Ergebnisse zeigen, dass NK-Zellen dazu in der Lage sind, eine Vielzahl an Zytokinen zu produzieren. Im Folgenden wurden die Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren in der Synovialflüssigkeit und den Seren der Patienten untersucht.

### 3 Definition autoimmuner und nicht-autoimmuner Zytokin- / Chemokinemuster

Aus der Literatur sind mehrere Zytokine und Chemokine bekannt, die in der Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten erhöht sind und für den Entzündungsprozess verantwortlich gemacht werden. Ein direkter Vergleich mehrerer Zytokine/Chemokine zwischen den Synovialflüssigkeiten beider Erkrankungen in Kombination mit autologem Serum und gesunden Normalspendern wurde bislang in diesem Umfang noch nicht publiziert. Daher stellt diese umfassende Analyse von 50 Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren ein einzigartiges Datenpaket dar, das die Definition eines autoimmunen und nicht-autoimmunen Musters erlaubt. In der Multiplexanalyse können 50 Analyte parallel in einer Probe quantifiziert werden. Verglichen wurden die Arthritis-Patientengruppe der entzündlichen, autoimmunen Gelenkerkrankungen und die Arthrose-Gruppe der nicht-autoimmunen und nicht-entzündlichen Erkrankungen. Aus der statistischen Einzelauswertung ging hervor, dass die meisten der 50 Parameter zwischen den Arthritis-Patienten und den Arthrose-Patienten signifikant unterschiedlich waren (siehe Tab. 14 und Tab. 15, Anhang S.155, 156). Diese Parameter stellen somit den Unterschied zwischen dem autoimmunen und dem nicht-autoimmunen Zytokinmuster dar, wobei zunächst diese einzelnen „Leit-Zytokine“ im Detail besprochen werden sollen, bevor auf die Musterbildung eingegangen wird.

#### 3.1 Chemokine und Rekrutierung von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen

CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen unterscheiden sich bekanntermaßen in der Expression von Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche (Campbell, Qin et al. 2001). CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen weisen eine hohe Expression von CCR5, CCR7, CXCR3 und CXCR4 auf, exprimieren CX3CR1 und CXCR2 nur sehr gering und zeigen keine Expression von CXCR1, CXCR2, CXCR5 und CCR1-4 und CCR9. CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> NK-Zellen hingegen exprimieren CXCR1, CX3CR1 und CXCR4 hoch, zeigen eine geringe Expression von CXCR2 und CXCR3, und keine CCR1-7 Expression. Diese Expressionsmuster wurden an peripheren NK-Zellen von Normalspendern weitgehend bestätigt. Da das Chemokinemilieu während Entzündungsreaktionen eine große Rolle bei der Rekrutierung von NK-Zellen spielt (Gregoire, Chasson et al. 2007), werden zunächst die NK-Zell-relevanten Chemokine besprochen.



**Abb. 29 Chemokinrezeptor-Liganden in der Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten im Vergleich zu den autologen Seren und Normalspenderseren**

Angegeben sind die Konzentrationen der Chemokinrezeptorliganden in den Synovialflüssigkeiten und den Seren der untersuchten Arthritis- und Arthrose-Patienten. Im Vergleich dazu sind die Normalspenderseren gezeigt. Die Konzentration ist in pg/ml angegeben und die Linie markiert den Mittelwert. Normalspender Seren (NS Se) n=23, Arthritis-Patienten Seren (Se) n=13, Arthritis-Patienten Synovialflüssigkeiten (SF) n=23, Arthrose-Patienten Seren (Se) n=18, Arthrose-Patienten Synovialflüssigkeiten (SF) n=19. Die Signifikanzwerte sind im Anhang in Tab. 14 (S.155) gezeigt.

In Abb. 29 sind die gemessenen Konzentrationen der Chemokine von Normalspendern und Patienten dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Signifikanzwerte im Anhang dargestellt (siehe Tab. 14, S.155). Zudem wurden Parameter mit Konzentrationen < 20 pg/ml trotz signifikanter Änderungen als biologisch nicht relevant eingestuft. Der CCR2 Ligand MCP-1 (CCL2) und die CXCR3 Liganden IP-10 (CXCL10) und MIG (CXCL9) sind in den Synovialflüssigkeiten von Arthritis und Arthrose-Patienten erhöht. Der CCR1/5 Ligand MIP-1β (CCL4), die CCR1/2 Liganden IL-8 (CXCL8) und GROα (CXCL1) und der CXCR4 Ligand SDF-1α (CXCL12) sind nur in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten erhöht.

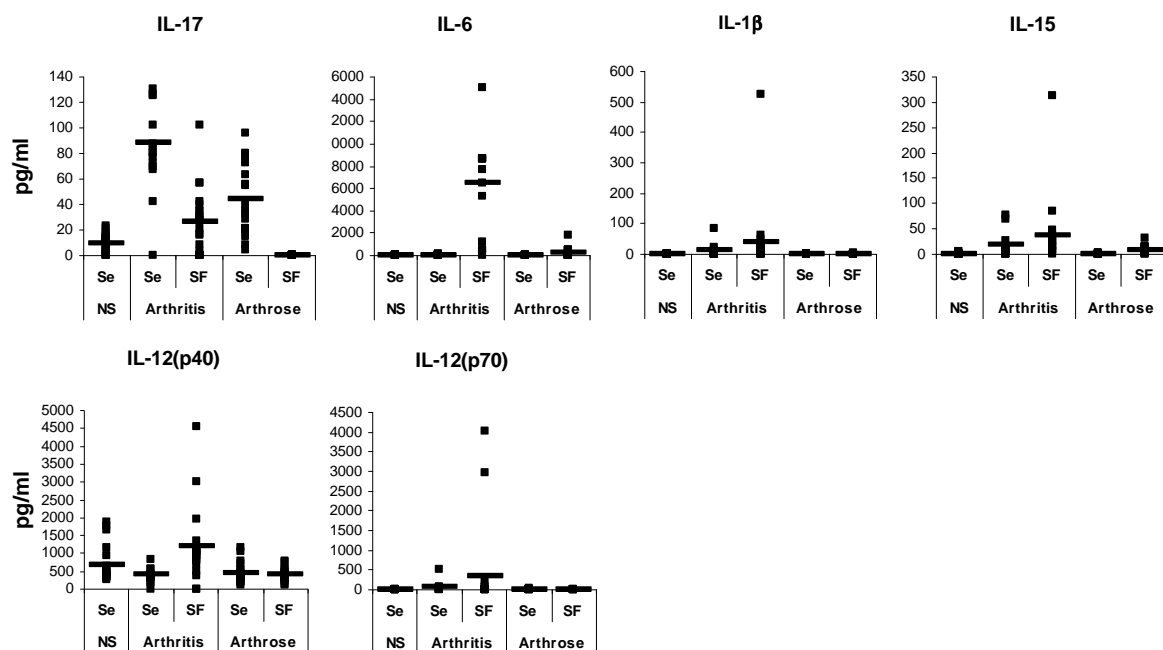
Der CCR1/5 Ligand MIP-1 $\alpha$  (CCL3) und der CCR2 Ligand MCP-3 (CCL7) zeigen zusätzlich zu erhöhten Konzentration in der Synovialflüssigkeit eine Erhöhung in den Seren der Arthritis-Patienten. Die Werte des CCR3 Liganden Eotaxin (CCL11) zeigen ebenfalls diese Tendenz, die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Der CCR1/5 Ligand RANTES (CCL5) war das einzige Chemokin, das in beiden Synovialflüssigkeiten im Vergleich zu den autologen Seren signifikant verringert war. Möglicherweise haben die CCR5 exprimierenden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in den Synovialflüssigkeiten RANTES gebunden und es ist daher löslich nicht mehr zu messen. Bei CTACK (CCL27) konnte eine signifikante Verringerung der Konzentration in der Synovialflüssigkeit der Arthrose-Patienten und im Serum der Arthritis-Patienten detektiert werden. Es ist jedoch fraglich, ob diese biologisch relevant ist, da in allen Patientengruppen und den Normalspender-Seren hohe Konzentrationen vorliegen. Nachdem die Dominanz von synovialen CD56<sup>bright</sup> CD6-negativen NK-Zellen sowohl in Arthritis- als auch in Arthrose-Patienten auftritt, ließ sich eine gute Korrelation auch zwischen geringen Chemokinkonzentrationen und der Infiltration von NK-Zellen in den Arthritis- und Arthrose-Patienten feststellen.

**Die Chemokine IP-10, MIG, MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  und SDF-1 $\alpha$  können über die Bindung an CXCR3, CCR5 und CXCR4, welche vorwiegend auf CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert sind, zur Rekrutierung der NK-Zellen in die Synovialflüssigkeit führen.**

### **3.2 IL-17 als Leitzytokin der T<sub>H</sub>17-Antwort in der autoimmunen Rheumatoiden Arthritis**

Die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen werden generell als die zytokinproduzierende NK-Zell-Subpopulation angesehen. Da die synovialen NK-Zellen als CD56<sup>bright</sup> CD6<sup>-</sup> definiert wurden, lag ein Hauptaugenmerk auf den von NK-Zellen bekanntermaßen sezernierten Zytokinen. Die detaillierte Analyse der Zytokin/Chemokin-Produktion der NK-Subpopulationen sowie der verantwortlichen Rezeptoren ist Bestandteil der Doktorarbeit von Monika Braun (AG Falk). Neben dem T<sub>H</sub>1-Hauptzytokin IFN- $\gamma$  können NK-Zellen nach Stimulation mit Zielzellen oder IL-2 eine Vielzahl anderer Zytokine produzieren, darunter TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-10 und IL-13 (eigene Beobachtungen Monika Braun)(Cooper, Fehniger et al. 2001). Peritt et al schlugen eine Klassifizierung der NK-Zellen auf der Grundlage der Zytokinproduktion in NK1 und NK2 Zellen vor (Peritt, Robertson et al. 1998). NK1 Zellen produzieren demnach IFN- $\gamma$ ,

TNF- $\beta$  und IL-10, NK2 Zellen produzieren IL-5 und IL-13. Für proinflammatorische Prozesse in Synovialflüssigkeiten von Arthritis- und Arthrose-Patienten stellt laut Literatur jedoch IL-17 das Leitzytokin dar (Singh, Aggarwal et al. 2007), dessen Produktion bisher nur von CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>17-Zellen bekannt ist. Abb. 30 zeigt, dass die Konzentration an IL-17 in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten tatsächlich signifikant erhöht ist. Zudem ist die IL-17-Konzentration in den Seren von Arthritis- und Arthrose-Patienten im Vergleich zu Normalspendern ebenfalls erhöht ( $p < 0,001$ ), wohingegen es in der Synovialflüssigkeit von Arthrose-Patienten vollständig fehlt. Dies stellt den größten Unterschied zwischen der autoimmunen Arthritis und der nicht-autoimmunen Arthrose in den Synovialflüssigkeit dar ( $p < 0,001$ ). Zu diesem Bild passt, dass in Seren und Synovialflüssigkeiten der Arthritis-Patienten im Vergleich zu den Arthrose-Patienten die IL-15- und IL-6-Konzentrationen viel stärker erhöht sind und IL-1 $\beta$  in den Synovialflüssigkeiten von Arthrose-Patienten vollständig fehlt.



**Abb. 30 T<sub>H</sub>17-Zytokinmuster in autoimmunen Arthritis-Patienten im Vergleich zu nicht-autoimmunen Arthrose-Patienten und Normalspendern**

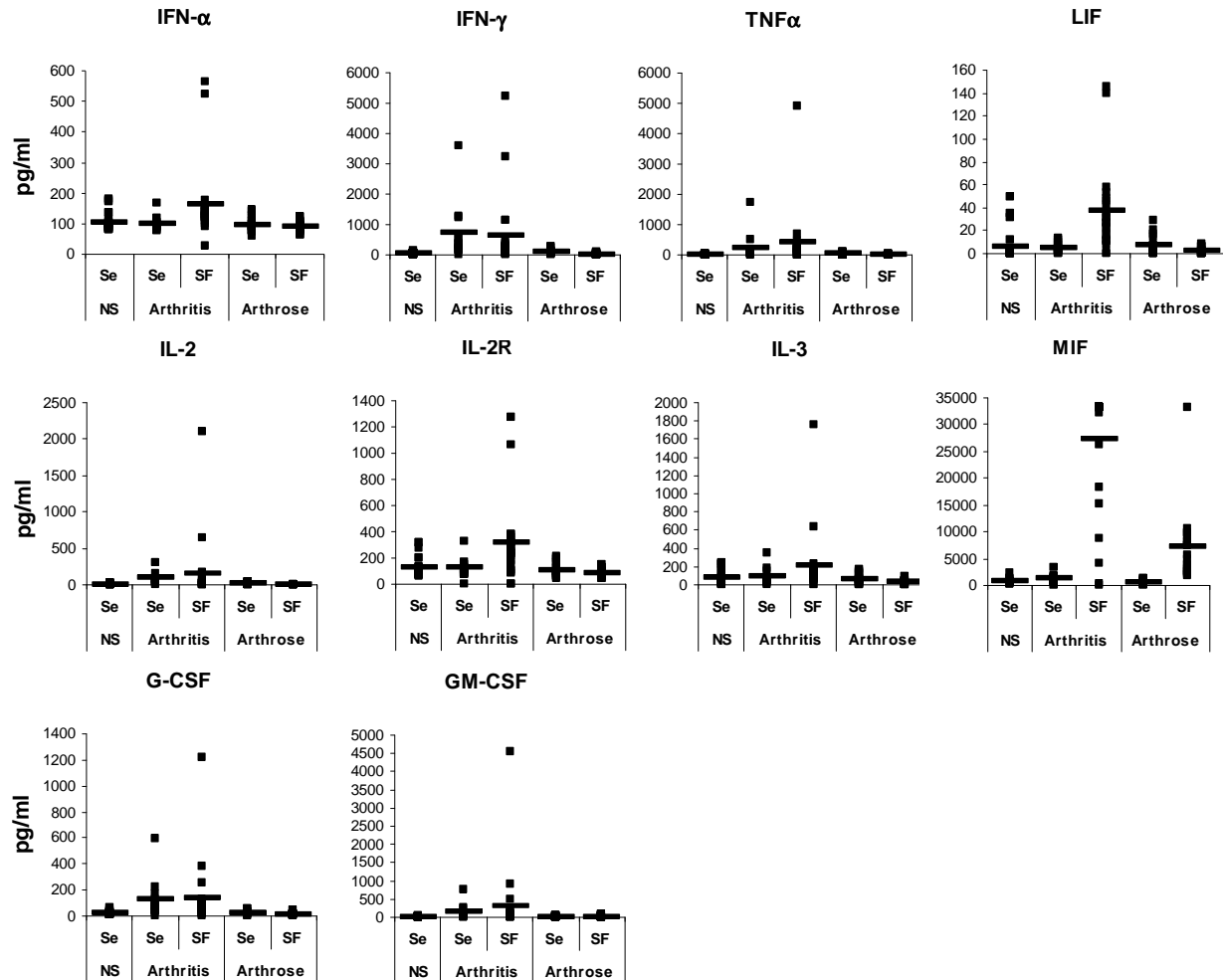
Gezeigt ist das T<sub>H</sub>17-Zytokinmuster der Arthritis-Patienten im Vergleich zu Arthrose-Patienten und Normalspendern. Die IL-17-Konzentration ist in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten und in den Seren der Arthritis- und Arthrose-Patienten signifikant erhöht. In der Synovialflüssigkeit von Arthrose-Patienten fehlt IL-17 vollständig, was den größten Unterschied zwischen autoimmunen und nicht-autoimmunen Patienten darstellt. Die Konzentrationen sind in pg/ml angegeben und die Linie markiert den Mittelwert. Normalspender Seren (NS Se) n=23, Arthritis-Patienten Seren (Se) n=13, Arthritis-Patienten Synovialflüssigkeiten (SF) n=23, Arthrose-Patienten Seren (Se) n=18, Arthrose-Patienten Synovialflüssigkeiten (SF) n=19. Die Signifikanzwerte sind im Anhang in Tab. 14 (S.155) gezeigt.

Für die Differenzierung der T<sub>H</sub>17-Zellen spielen IL-1 $\beta$  und IL-6 eine wichtige Rolle, da sie T-Helferzellen zur IL-17 Produktion anregen (Acosta-Rodriguez, Napolitani et al. 2007, Wilson, Boniface et al. 2007, Gaston 2008). IL-15 stimuliert ebenfalls die IL-17 Produktion von

primären PBMC (Ziolkowska, Koc et al. 2000, Gaston 2008). Außerdem ist IL-23 essentiell für die Expansion und das Überleben von T<sub>H</sub>17-Zellen und wird für die Initiierung der T<sub>H</sub>17 vermittelten Immunantwort benötigt (Langrish, Chen et al. 2005). IL-23 ist ein heterodimeres Protein aus einer p19 und p40 Untereinheit und teilt seine p40 Untereinheit mit IL-12 (p35 und p40 Untereinheit). IL-12 und IL-23 werden hauptsächlich von Dendritischen Zellen produziert, die somit festlegen können, ob sich T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>17-Zellen entwickeln.

Die Anwesenheit von IL-17 hat Auswirkungen auf andere Zytokine. So wurden in den Synovialflüssigkeiten von Arthritis-Patienten auch wesentlich höhere Konzentrationen an T<sub>H</sub>1 Zytokinen detektiert. Neben IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12(p70) und IL-12(p40), der gemeinsamen Untereinheit von IL-12 und IL-23 (Abb. 30), dominieren in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten signifikant noch weitere proinflammatorische Zytokine, wie IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  und TNF- $\alpha$  (Abb. 31).

IL-17 ist nicht nur an den Entzündungsprozessen im Gelenk beteiligt, sondern wirkt auch direkt auf den Knorpel und den Knochen, wobei es den Stoffwechsel der Chondrozyten inhibiert, und die Produktion von Metalloproteasen stimuliert. IL-17 ist mit TNF- $\alpha$ , M-CSF und RANKL an der Entwicklung von Osteoklasten beteiligt und stimuliert synoviale Fibroblasten und Endothelzellen zur Produktion von IL-6, IL-8 und G-CSF (Kotake, Udagawa et al. 1999, Sato 2008). In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen nach der Stimulation aktivierender Rezeptoren wie CD16, NKp30, NKp46 und NKG2C nach 48 bzw. 96 Stunden ebenfalls dazu in der Lage sind, IL-17 zu produzieren (Daten Monika Braun, AG Falk). Somit können auch die synovialen NK-Zellen für das T<sub>H</sub>17 Zytokinmuster mit verantwortlich sein. Diese Hypothese wird in weiterführenden Experimenten mit frischen Synovialflüssigkeiten bearbeitet.

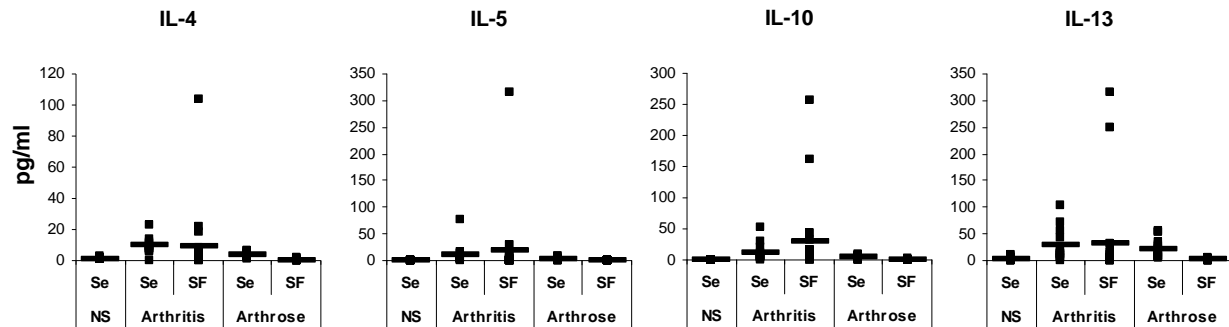


**Abb. 31** T<sub>H</sub>1- und andere pro-inflammatorische Zytokine

Gezeigt ist das T<sub>H</sub>1-Zytokinmuster und weitere pro-inflammatorische Zytokine der Arthritis-Patienten im Vergleich zu Arthrose-Patienten und Normal Spendern. In der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten dominieren T<sub>H</sub>1 Zytokine wie IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Die Konzentrationen sind in pg/ml angegeben und die Linie markiert den Mittelwert. Normalspender n=23, Arthritis-Patienten Seren (Se) n=13, Arthritis-Patienten Synovialflüssigkeiten (SF) n=23, Arthrose-Patienten Seren (Se) n=18, Arthrose-Patienten Synovialflüssigkeiten (SF) n=19. Die Signifikanzwerte sind im Anhang in Tab. 14 (S.155) gezeigt.

Abb. 31 zeigt auch, dass in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten wesentlich höhere Konzentrationen weiterer pro-inflammatorischer Zytokine detektierbar sind als in der Synovialflüssigkeit von Arthrose-Patienten. Dazu gehört auch LIF, welches mit gp130 die gleiche Rezeptorkomponente wie IL-6 verwendet. Außerdem sind auch der T-Zellwachstumsfaktor IL-2, dessen löslicher IL-2 Rezeptor (CD25), das DC stimulierende Zytokin IL-3 und die hämatopoetischen Faktoren G-CSF und GM-CSF, sowie MIF signifikant erhöht. IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , MIF, IL-2, G-CSF und GM-CSF waren bereits im Serum der Patienten signifikant erhöht, was auf eine über das Gelenk hinausgehende pro-inflammatorische Situation in der Peripherie hindeutet.

Die  $T_H1/T_H17$ -Zytokinantwort dominiert eindeutig das Geschehen in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten, dennoch konnten auch einige  $T_H2$ -Zytokine detektiert werden, welche jedoch in wesentlich geringeren Konzentrationen detektierbar waren, und vor allen in den Arthrose-Synovialflüssigkeiten kaum messbar waren (Abb. 32).



**Abb. 32**  $T_H2$  Zytokine in den Synovialflüssigkeiten und Seren von Arthritis- und Arthrose-Patienten im Vergleich zu Normalspender Seren

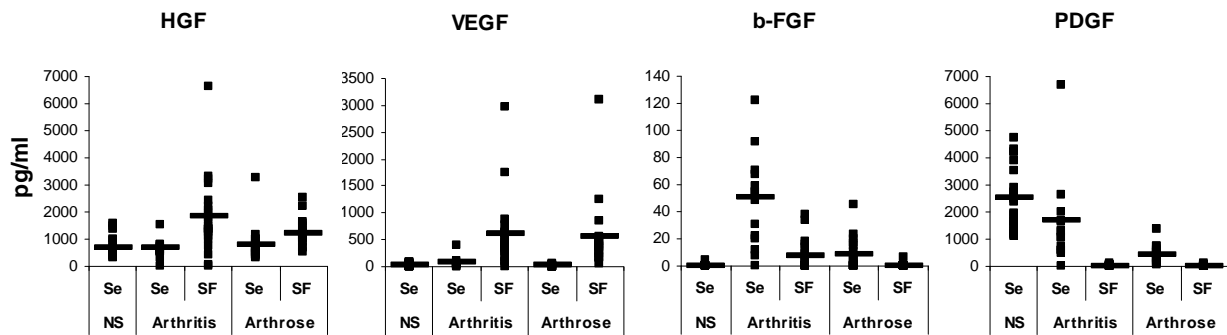
Die  $T_H2$ -Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 waren in den Seren und Synovialflüssigkeiten von Arthritis-Patienten in sehr geringen Konzentrationen messbar. Bei Arthrose-Patienten konnten sie kaum detektiert werden. Die Konzentrationen sind in pg/ml angegeben und die Linie markiert den Mittelwert. Normalspender Seren (NS Se) n=23, Arthritis-Patienten Seren (Se) n=13, Arthritis-Patienten Synovialflüssigkeiten (SF) n=23, Arthrose-Patienten Seren (Se) n=18, Arthrose-Patienten Synovialflüssigkeiten (SF) n=19. Die Signifikanzwerte sind im Anhang in Tab. 15 (S.156) gezeigt.

Die  $T_H2$ -Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 waren in der Synovialflüssigkeit und in den Seren der Arthritis-Patienten erhöht, IL-13 war zusätzlich im Serum der Arthrose-Patienten erhöht. In der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten scheint also ein Mosaikmuster aus einer  $T_H1$ ,  $T_H2$  und einer  $T_H17$  Antwort vorzuliegen, das zwar in der Literatur postuliert wird (Sato 2008), in dieser Arbeit aber zum ersten Mal im direkten Vergleich dargestellt werden konnte. Weitere Daten von hier nicht aufgeführten Zytokinen und Chemokinen finden sich im Anhang Abb. 57 (S.154). Aus Platzgründen wurde auf eine detaillierte Darstellung an dieser Stelle verzichtet, da weitere pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-1 $\alpha$ , IL-16, IL-18, M-CSF, TNF- $\beta$ , IL-7 und IL-9 wie zu erwarten in Konsequenz aus der starken Inflammation ebenfalls erhöht sind. Interessanterweise ist der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA) in den Synovialflüssigkeiten und den Seren der Arthritis-Patienten ebenfalls erhöht, was auf den Versuch des Immunsystems hindeutet, die Inflammation „abzufangen“. Durch die extensive Dysregulation vieler Komponenten ist dies jedoch offensichtlich nicht erfolgreich.



### 3.3 Wachstumsfaktoren für Knorpel- und Knochenkomponenten in der Synovialflüssigkeit

Synoviale Fibroblasten sind in der Lage, verschiedene Wachstumsaktoren zu produzieren, welche an den Vaskularisations- und den Entzündungsprozessen in den Gelenken der Arthritis und Arthrose-Patienten beteiligt sind. Verschiedene Wachstumsfaktoren, wie HGF, VEGF, b-FGF und PDGF sind auch an der Hyperplasie der synovialen Membran beteiligt und verbinden so die Signale der Entzündung mit der Schädigung des Knorpels (McInnes and Schett 2007). Beispielhaft für das Netzwerk an Wachstumsfaktoren sei HGF erwähnt, das bei synovialen Fibroblasten die MCP-1 (CCL2) Sekretion induziert, was wiederum zu einer Infiltration von Monozyten und Makrophagen beiträgt.



**Abb. 33 Wachstumsfaktoren in Synovialflüssigkeiten von Arthritis- und Arthrose-Patienten im Vergleich zu autologen- und Normalspender-Seren**

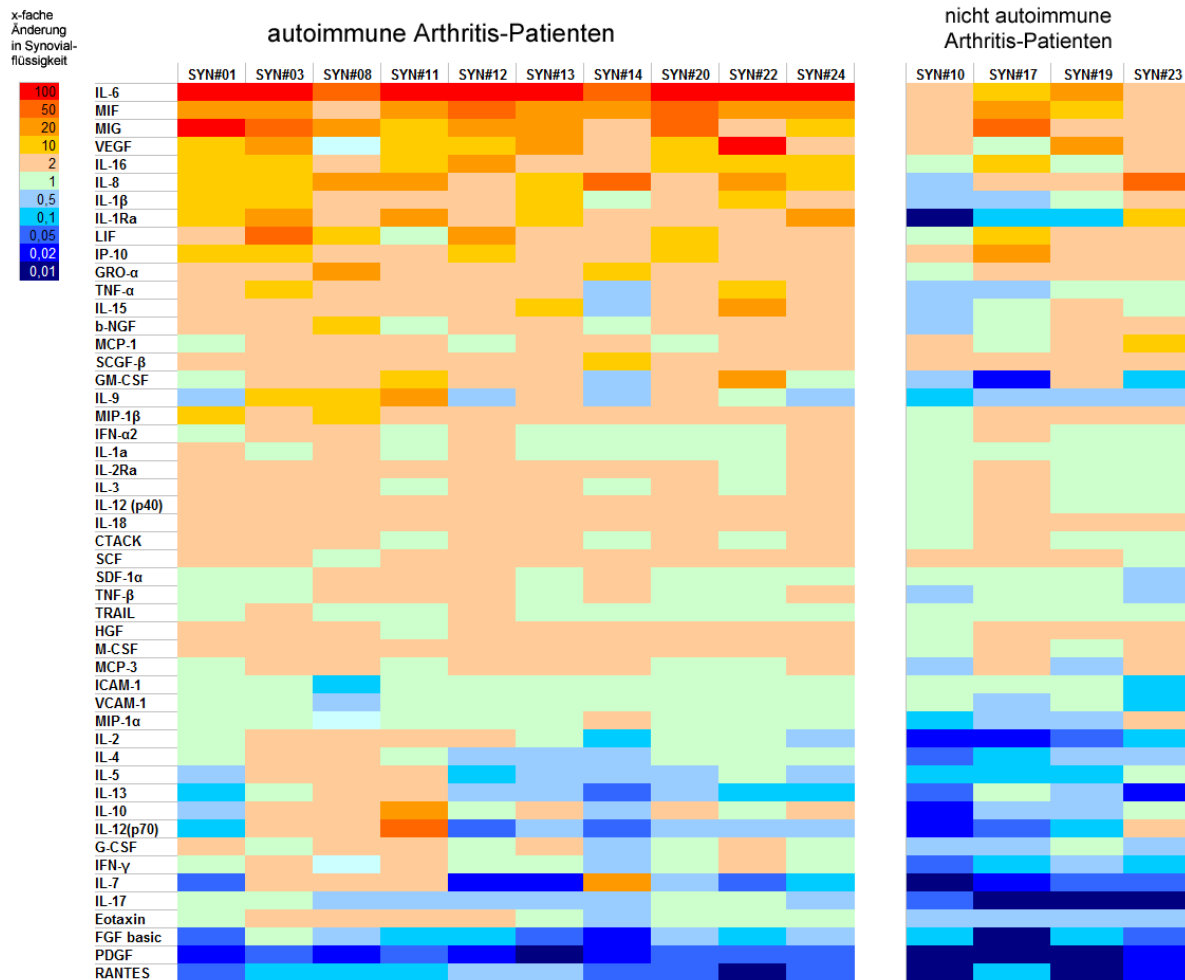
Die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren HGF und VEGF sind in den Synovialflüssigkeiten von Arthritis- und Arthrose-Patienten erhöht. b-FGF und PDGF sind im Gegensatz dazu nur in den Seren der Patienten signifikant erhöht. Die Konzentrationen sind in pg/ml angegeben und die Linie markiert den Mittelwert. Normalspender Seren (NS Se) n=23, Arthritis-Patienten Seren (Se) n=13, Arthritis-Patienten Synovialflüssigkeiten (SF) n=23, Arthrose-Patienten Seren (Se) n=18, Arthrose-Patienten Synovialflüssigkeiten (SF) n=19. Die Signifikanzwerte sind im Anhang in Tab. 15 (S.156) gezeigt.

In beiden Synovialflüssigkeiten sind die Konzentration für HGF und VEGF signifikant erhöht (Abb. 33, Signifikanzen siehe Tab. 15, Anhang S.156). Im Gegensatz dazu ist b-FGF im Vergleich zu Normalspender-Seren nur in den Seren der Patienten signifikant erhöht, in den Synovialflüssigkeiten der Patienten dagegen erniedrigt. PDGF ist der einzige Wachstumsfaktor, der sowohl in den Seren als auch in den Synovialflüssigkeiten der Patienten eine signifikante Erniedrigung zeigt.

In den Synovialflüssigkeiten von Arthritits- und Arthrose-Patienten liegen im Vergleich zu den autologen Seren erhöhte Chemokin-Konzentrationen vor, wobei bei Arthrose-Patienten wesentlich weniger Faktoren erhöht sind. Dies deutet auf eine selektive Rekrutierung von  $CD56^{\text{bright}}CD6^{-}$  NK-Zellen hin, wobei auch T-Zellen durch die Chemokine rekrutiert werden können. In der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten liegt im Vergleich zu Arthrose-Patienten eine dominante  $T_H17$ -Immunantwort vor, die vor allem von  $T_H1$ -Zytokinen, abgeschwächt auch von  $T_H2$ -Zytokinen, eskortiert wird. Bei Arthritis-Patienten liegt also vorwiegend ein  $T_H1/T_H17$ -Mosaikmuster vor, das durch das  $T_H17$ -Milieu dominiert wird, welches wiederum die Produktion anderer Zytokine maßgeblich beeinflusst. Im Unterschied dazu findet in den Synovialflüssigkeiten der Arthrose-Patienten keine IL-17-Produktion statt, wodurch die positive Rückkopplung und Amplifikation der autoimmunen Entzündungsreaktion fehlt. Hier finden sich zwar  $T_H1$ -Zytokine, die jedoch immer in wesentlich geringeren Konzentrationen als bei Arthritis-Patienten vorliegen. Die Verschiebung der Wachstumsfaktoren-Verhältnisse zu Ungunsten der PDGF/b-FGF-Signale könnte einen Beitrag zu einem Knorpel-Knochenabbau durch fehlende Regenerationssignale leisten.

### **3.4 Zytokinmuster in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zum Serum der Arthritis- und Arthrose-Patienten**

In den vorhergehenden Abschnitten wurden die Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren einzeln analysiert und die  $T_H17$ -Immunantwort in den Arthritis-Patienten im Gegensatz zu den Arthrose-Patienten als Hauptunterscheidungsmerkmal identifiziert. Es gestaltete sich jedoch schwierig, das vollständige autoimmune Zytokinmuster anhand der Einzelbetrachtung der 50 verschiedenen Faktoren zu definieren. Aus diesem Grund wurde für die Muster-bezogene Auswertung keine quantitative Darstellung der Einzelergebnisse gewählt, sondern die Ratio aus der Zytokin/Chemokinkonzentration in der Synovialflüssigkeit und der Konzentration im autologen Serum des Patienten gebildet. Es wurde manuell eine sogenannte „Heatmap“ angefertigt, die aus den mRNS-Expressionsanalysen bekannt ist. Hierdurch wird deutlich, welche Faktoren sich wie stark am Ort der Entzündung, nämlich in der Synovialflüssigkeit, verändern.

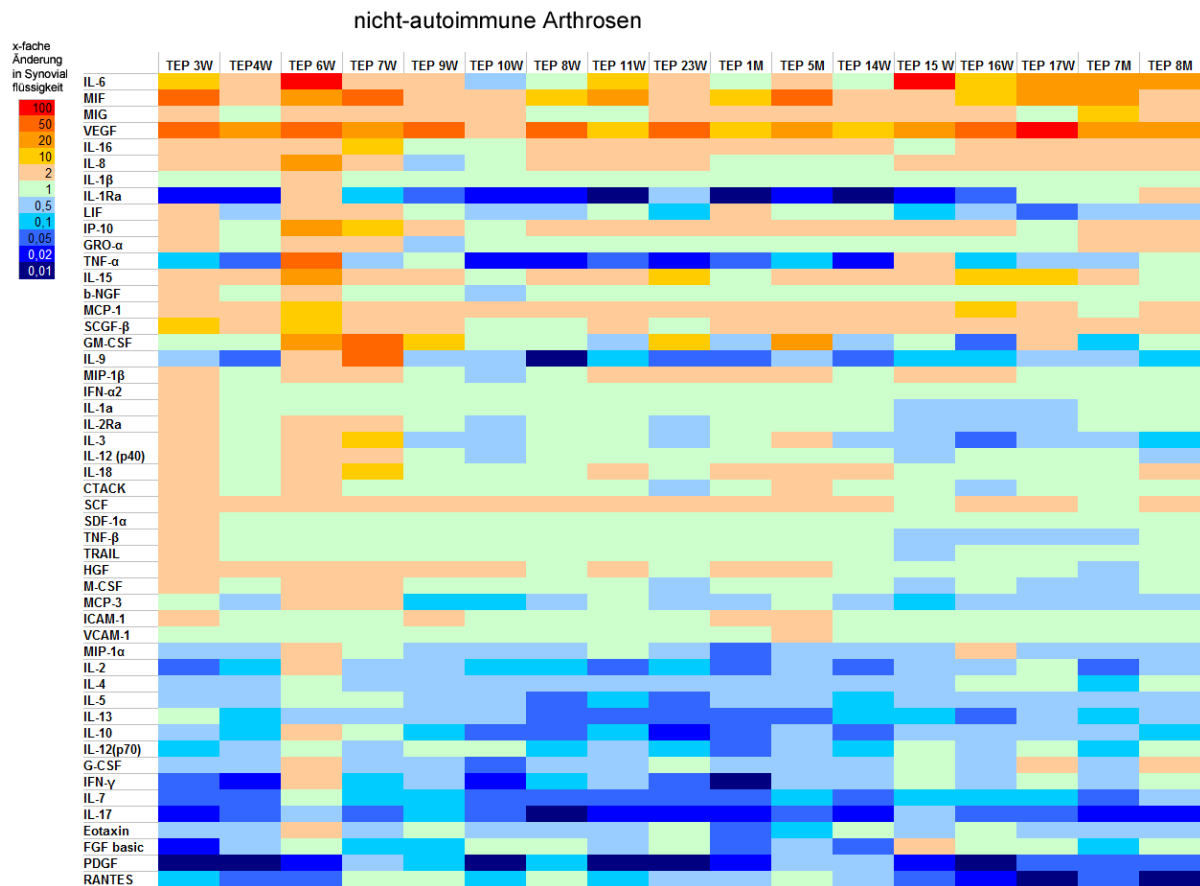


**Abb. 34** Änderung der Zytokine in der Synovialflüssigkeit von autoimmunen und nicht-autoimmunen Gelenkentzündungen im Vergleich zu autologem Serum

Gezeigt ist die Ratio der Zytokinkonzentrationen der Synovialflüssigkeiten und des jeweiligen autologen Serum. Die Skala links gibt den Faktor der Erniedrigung bzw. Erhöhung der Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit an. Blau: Konzentration verringert sich in der Synovialflüssigkeit um mehr als den Faktor 0,01, rot: Konzentration ist in der Synovialflüssigkeit um mehr als das 100-fache erhöht.

In der Patientengruppe aus der Rheuma-Ambulanz befanden sich neben den eindeutig diagnostizierten Arthritis-Patienten auch drei nicht autoimmune Arthritis Erkrankungen (SYN#10 Lyme Arthritis, SYN#18 Arthritis urica, SYN#19 Aktivierte Arthrose) und fünf undifferenzierte Poly- oder Oligoarthrosen, welche ebenfalls nicht als autoimmun definiert waren (SYN#04, #06, #16, #17 und #23). Diese Patienten verblieben zunächst in der Arthritisgruppe, da sie sich bezüglich der NK-Zellinfiltration nicht von den autoimmunen Patienten unterscheiden. Bezüglich des Zytokinmusters zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede, die in Abb. 34 dargestellt sind. In dieser Abbildungen sind nur diejenigen Patienten gezeigt von denen sowohl Synovialflüssigkeit als auch autologes Serum vorlag, so dass die Ratio berechnet werden konnte. Man erkennt, dass sich vier Patienten aufgrund ihres Zytokinmusters, hervorgehoben durch die farbliche Markierung, deutlich von den restlichen Patienten abheben und ein „anti-inflammatorisches“ Muster aufweisen. Durch diese Ratio-

bezogene Darstellungsweise fällt zwar die dominante T<sub>H</sub>17-Antwort in der autoimmunen Synovialflüssigkeit nicht ins Auge, da sich die Konzentration im Vergleich zum autologen Serum erniedrigt (Abb. 30), die Zytokine IL-6 und IL-1 $\beta$ , welche für die IL-17 Produktion essentiell sind, sind jedoch am stärksten erhöht. Zudem sieht man deutlich die Erhöhung der Chemokine MIG (CXCL9), IL-8 (CXCL8) und IP-10 (CXCL10) (Vgl. mit Abb. 29). Zudem sind andere proinflammatorische Faktoren wie MIF, IL-16, IL-1RA, LIF und der Vaskularisierungsfaktor VEGF stark erhöht. Dagegen fällt die untergeordnete Rolle der T<sub>H</sub>2-Zytokine auf (Vgl. mit Abb. 32), da IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 tendenziell herunterreguliert werden, oder im Vergleich mit dem Serum unverändert bleiben. Einige Faktoren, wie PDGF, RANTES, b-FGF und Eotaxin, bleiben in der Synovialflüssigkeit interessanterweise stark erniedrigt. Das Zytokinmilieu in nicht autoimmunen, entzündlichen Gelenkerkrankungen weist große Unterschiede zu diesem autoimmunen Arthritismuster auf. Man findet hier vermehrt eine Verringerung vieler Faktoren in der Synovialflüssigkeit, z.B. werden MIP-1 $\alpha$ , IL-2 und IL-12(p70) im nicht-autoimmunen Kontext neben den T<sub>H</sub>2-Zytokinen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zum Serum herunterreguliert. Die Erhöhung von IL-6, MIF, MIG, VEGF und IL-16 überschneidet sich dagegen mit den autoimmunen Arthritiden. Diese Faktoren stellen also die allgemeinen Entzündungsmarker dar, welche immer erhöht sind. Bemerkenswert ist, dass sich die Lyme-Arthritis (Borreliose, SYN#10), welche durch eine bakterielle Infektion mit *Borrelia burgdorferi* Bakterien verursacht wird, von den drei anderen ebenfalls nicht autoimmunen Arthritiden unterscheidet, wobei sich auch hier keine Erhöhung der allgemeinen Entzündungsfaktoren zeigt. Um den Unterschied des autoimmunen Musters zu dem nicht-autoimmunen Muster nochmals zu bestätigen, wurde die Änderung des Zytokin/Chemokinmilieus auch in der Synovialflüssigkeit von nicht-autoimmunen Arthrose-Patienten untersucht, und ebenfalls die Ratio zwischen Synovialflüssigkeit und Serum gebildet.



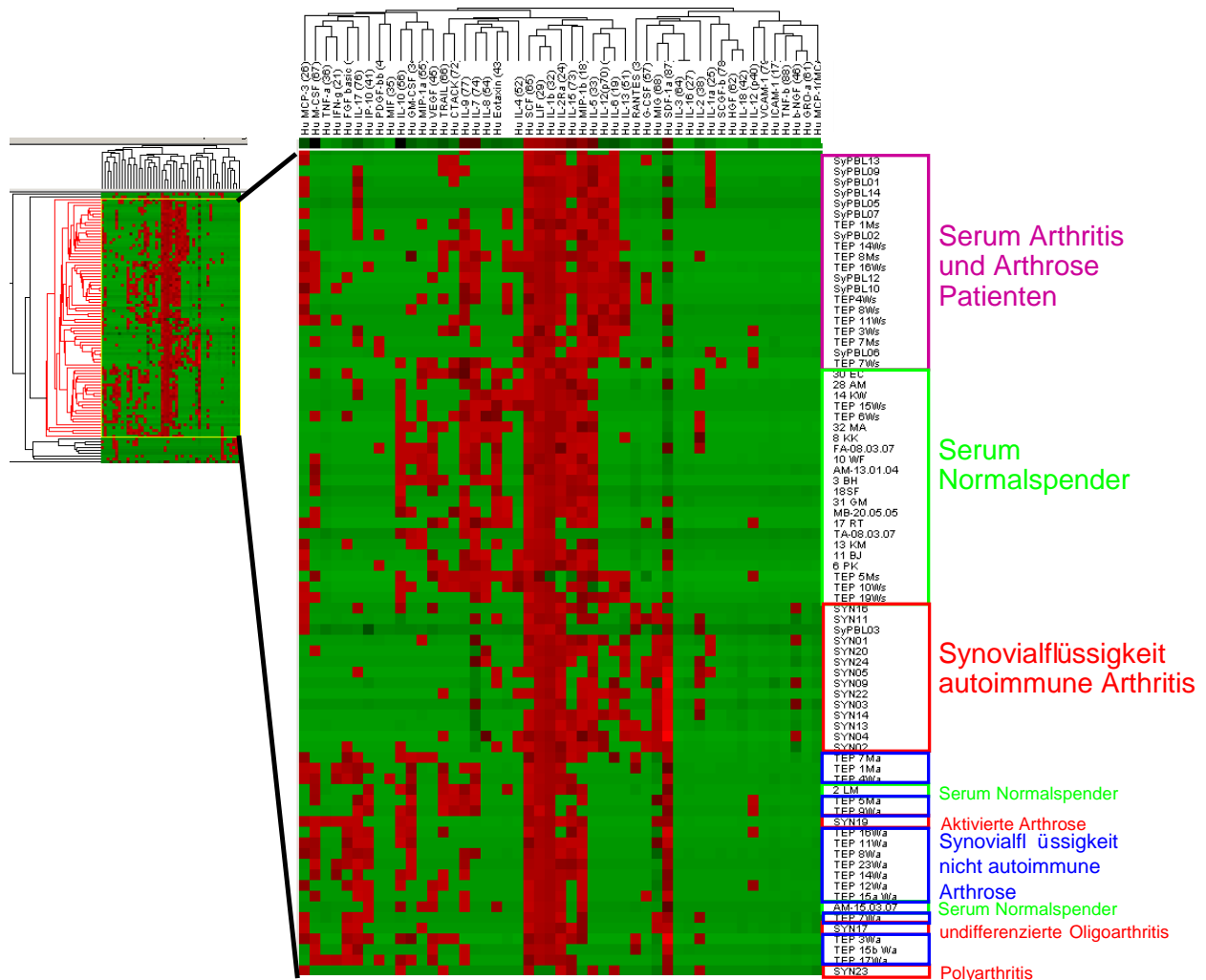
**Abb. 35** Änderung der Zytokine in der Synovialflüssigkeit von Gonarthrose-Patienten im Vergleich zu autologem Serum

Gezeigt ist die Ratio der Zytokinkonzentrationen der Synovialflüssigkeiten und des jeweiligen autologen Serums. Die Skala links gibt den Faktor der Erniedrigung bzw. Erhöhung der Konzentrationen in den Synovialflüssigkeit an. **Blau:** Die Konzentration verringert sich in der Synovialflüssigkeit um mehr als den Faktor 0,01. **Rot:** Die Konzentration ist in der Synovialflüssigkeit um mehr als das 100-fache erhöht.

In Abb. 35 ist deutlich zu erkennen, dass das Muster der Veränderungen in der Synovialflüssigkeit bei nicht-autoimmunen Gonarthrosen stark dem der vier nicht-autoimmunen Arthritis-Patienten ähnelt. Auch bei den Arthrose-Patienten sind IL-6, MIF, MIG und VEGF erhöht, was bedeutet, dass auch hier leichte Entzündungsprozesse stattfinden. Dagegen werden IL-1RA, TNF $\alpha$  und IL-9 in den Synovialflüssigkeiten von Arthrose-Patienten immer deutlich herunterreguliert. Zudem sind wie bei den nicht-autoimmunen Arthritis-Patienten MIP-1 $\alpha$ , IL-2, IL-12(p70) und die T<sub>H</sub>2-Zytokine herunterreguliert. Aus diesen Abbildungen wird klar, dass das deutliche autoimmune Arthritis-Muster einem nicht-autoimmunen Arthrose-Zytokinmuster gegenüber steht.

Um diese manuell erstellten Muster nochmals bestätigen zu lassen, wurden die Zytokin/Chemokindaten der Patienten und der Normalspender mit der „Genepilot“-Software analysiert. Hierbei handelt es sich um eine professionelle Software zur Erstellung von mRNS Expressionsanalysen, welche überprüft, ob sich Muster in den gemessenen Daten erkennen

lassen und ob dadurch die Klassifizierung der Patienten und Normalspender in relevante klinische Gruppen möglich ist. Die Daten wurden hierbei „unsupervised“ analysiert, das heißt die Software erhält vor der Berechnung keine Information über die klinische Herkunft der verschiedenen Patienten- bzw. Normalspendergruppen. Die Ergebnisse werden von der Software in einer hierarchischen „Cluster“-Analyse so angeordnet, dass ähnliche Daten nebeneinander stehen. Dabei ergibt sich die charakteristische Darstellungsweise des Cluster-Dendrogramms, einer so genannten „Heatmap“. Rot steht hierbei für eine hohe Konzentration der Zytokine/ Chemokine und grün für eine niedrige Konzentration.



**Abb. 36 Analyse der Zytokinexpressionsmuster mit Hilfe der Genepilot-Software**

Mittels der Genepilot-Software erfolgte eine „unsupervised“ Cluster-Analyse der Rohdaten der Zytokin/ Chemokin-Multiplexanalyse. Die Software gruppierte die Patienten und Normalspender anhand der Messwerte, ohne dass sie vorher Informationen über den klinischen Hintergrund der Spender und Patienten erhalten hat.

Abb. 36 zeigt einen Ausschnitt der Heatmap, welche von der Genepilot-Software erstellt wurde. Vertikal sind die Patienten- und Normalspenderproben aufgetragen, horizontal die 50 verschiedenen in der Multiplex Analyse gemessenen Faktoren. Man sieht deutlich, dass die

Software eine klare Gruppierung der Patienten und Normalspender anhand der Messwerte durchführen konnte, in der jeweils eine Gruppe der Normalspender (grün), der Seren beider Patientengruppen (lila) und der Synovialflüssigkeit der autoimmunen Arthritis-Patienten (rot) zu erkennen sind. Eine vierte Gruppe beinhaltet die Synovialflüssigkeiten der nicht-autoimmunen Arthrose-Patienten (blau). Diese Gruppe wird durch zwei Normalspenderseren und drei Synovialflüssigkeiten aus dem Arthritis-Kollektiv durchbrochen, wobei es sich exakt um die nicht-autoimmune aktivierte Arthrose und die beiden diagnostisch unklaren Arthritiden handelt. Diese „Heatmap“ entspricht in weiten Teilen der manuell angefertigten Zuordnung (Abb. 34 und Abb. 35) und ermöglicht eine zusätzliche Integration der Normalspenderseren, zu denen natürlich keine Synovialflüssigkeiten vorliegen. Die Genepilot Software war dazu in der Lage, das autoimmune Zytokinmuster der Synovialflüssigkeit der Arthritis-Patienten klar von den Seren, und der nicht-autoimmunen Synovialflüssigkeit zu trennen.

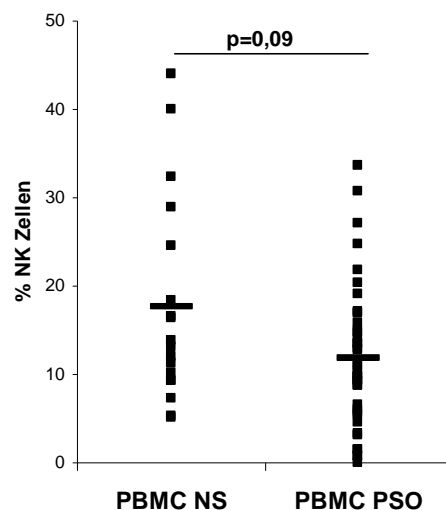
**Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die umfassende Zytokin-/Chemokinanalyse in dieser Arbeit erstmals ein autoimmunes, von einem nicht-autoimmunen Zytokinmuster unterschieden werden konnte. Nicht autoimmune Arthritis-Patienten unterscheiden sich in diesem Muster deutlich von Reaktiven und Rheumatoiden Arthritis-Patienten. Es war zudem möglich, dieses Muster durch eine Softwareanalyse bestätigen zu lassen, welche ebenfalls klare Gruppierungen von Normalspendern und Patienten erstellen konnte.**

## 4 NK-Zellen im Kontext der Psoriasis vulgaris

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die NK-Zellen im Kontext autoimmuner Arthritiden beschrieben. Als Vergleich mit einer anderen Autoimmunkrankheit wurden NK-Zellen im Kontext der Psoriasis vulgaris untersucht. Dabei handelt es sich um eine T-Zell-vermittelte Autoimmunkrankheit, die sich hauptsächlich an der Haut, aber zum Teil auch als Psoriasis Arthritis an den Gelenken manifestiert. Interessanterweise kamen die ersten Hinweise für eine Rolle der KIR-Gene in der Autoimmunität aus dem Bereich der Psoriasis Arthritis. Von den Psoriasis-Patienten lagen leider nur Blutproben vor, daher konnten nur periphere NK-Zellen und nicht die NK-Zell-Rekrutierung in die Synovialflüssigkeit der Psoriasis Arthritis bzw. in die Haut untersucht werden. Darüber hinaus wurden umfangreiche Experimente mit peripheren NK-Rezeptor-positiven T-Zellen durchgeführt, die aus Platzgründen jedoch keinen Eingang in die schriftliche Arbeit gefunden haben.

### 4.1 Verringerte Frequenz peripherer CD56<sup>dim</sup>CD6<sup>+</sup> NK-Zellen bei Psoriasis vulgaris

Die Frequenz der gesamten peripheren NK-Zellen bei Psoriasis-Patienten ist im Vergleich zu Normalspendern nicht signifikant verringert (Abb. 37). Dieses Ergebnis entspricht den Frequenzänderungen bei Arthritis und Arthrose-Patienten (siehe Abb. 15). Die NK-Zell-Degeneration bei Autoimmunkrankheiten konnte also auch durch das Psoriasis-Patientenkollektiv nicht bestätigt werden.

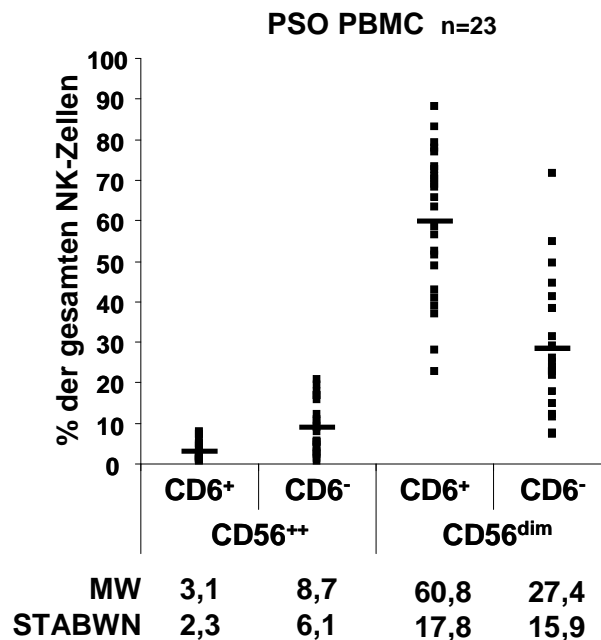


**Abb. 37 Frequenz der peripheren NK-Zellen bei Psoriasis vulgaris-Patienten**

Dargestellt sind die Ergebnisse durchflusszytometrischer Analysen. Es wurden PBMC von 39 Psoriasis-Patienten mit CD3 und CD56 Antikörpern gefärbt und der prozentuale Anteil der CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-Zellen an der gesamten Lymphozytenzahl ausgewertet. Die Linie markiert den Mittelwert. Die Statistik wurde mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet.



Nach langer Kontroverse über die Anwesenheit von NK-Zellen in der Haut, kann bei Psoriasis vulgaris ebenfalls eine Anhäufung von  $CD56^{\text{bright}} CD16^-$  Zellen in der Haut beobachtet werden (Ottaviani, Nasorri et al. 2006). Nachdem meine Untersuchungen der Gelenkerkrankungen eine herausragende Rolle von CD6 als Infiltrationsmarker auf NK-Zellen ergaben, wurde die Expression von CD6 auf NK-Zellen auch in den PBMC von Psoriasis-Patienten untersucht. Wie in Abb. 22 zu sehen ist, lag im Blut von Arthritis-Patienten eine Art „Zwischenzustand“ der  $CD6^{+/-}$  NK-Zell-Population vor. Hier sollte nun eruiert werden, ob diese verschobene NK-Zell-Verteilung auch im Blut von Psoriasis-Patienten vorliegt. Es wurden dazu die PBMC von 41 Psoriasis-Patienten isoliert. Die NK-Zellen wurden dann phänotypisch durch FACS-Analysen charakterisiert.



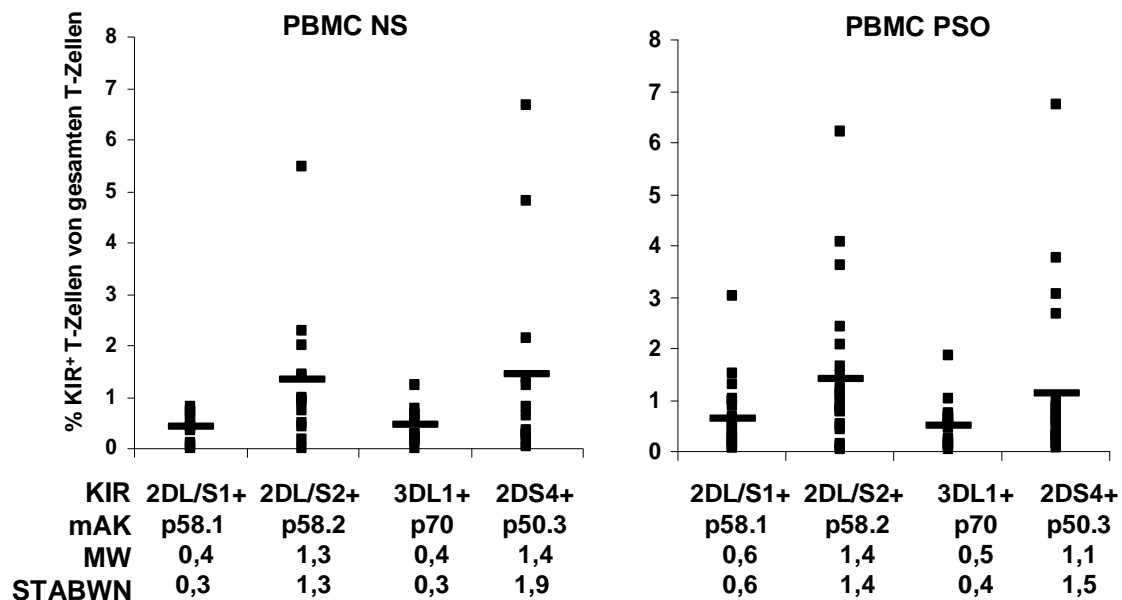
**Abb. 38** CD6-Expression auf peripheren  $CD56^{\text{bright}}$  und  $CD56^{\text{dim}}$  NK-Zellen bei Psoriasis-Patienten  
Färbung von PBMC, isoliert aus Psoriasis-Patienten, mit  $CD56$ ,  $CD6$  und  $CD3$  Antikörpern. Gegatet auf  $CD56^+CD3^-$  NK-Zellen. Analyse der prozentualen CD6-Expression auf NK-Zellen bezogen auf die gesamte Anzahl der NK-Zellen. PBMC PSO n=23. Linie markiert den Mittelwert. STABWN: Standardabweichung

Bei Normalspendern korreliert die CD6-Expression auf peripheren NK-Zellen stark mit dem  $CD56^{\text{dim}}$  Phänotyp (Vgl. Abb. 22), wobei 70,5 % der NK-Zellen hier  $CD56^{\text{dim}} CD6^+$  sind. Bei Psoriasis-Patienten ist die CD6-Expression auf  $CD56^{\text{dim}}$  NK-Zellen signifikant niedriger ( $60,8 \pm 17,8$  %,  $p=0,05$ ), und entspricht damit der von Arthrose-Patienten ( $58,3 \pm 12,1$  %,  $p=0,6$ ) (Vgl. Abb. 22). Vergleicht man die PBMC der Psoriasis-Patienten mit den ebenfalls autoimmunen Arthritis-Patienten (Abb. 22), so sieht man, dass diese tendenziell weniger  $CD6^+CD56^{\text{dim}}$  NK-Zellen (43,8 %) besitzen, wobei dieser Unterschied jedoch nicht signifikant ist ( $p=0,2$ ). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung einer Art des „Zwischenzustand“ in

der Peripherie der drei Patientengruppen (Vgl. 1.4, S.70). Die Modulation des peripheren NK-Zell Repertoires könnte demnach mit dem Schweregrad der Entzündungsreaktion zusammenhängen, da diese bei Arthritis-Patienten wesentlich stärker ausfällt, weshalb diese sich am stärksten von Normalspendern unterscheiden.

## 4.2 KIR<sup>+</sup> T-Zellen bei Psoriasis vulgaris

Bei Psoriasis Arthritis (Martin, Nelson et al. 2002, Williams, Meenagh et al. 2005) und Psoriasis vulgaris (Luszczek, Manczak et al. 2004) wurde als eine der ersten Autoimmunkrankheiten eine genetische Assoziation mit dem Polymorphismus des KIR-Genlokus beschrieben. Nachdem Psoriasis vulgaris vorwiegend eine T-Zell-vermittelte Autoimmunkrankheit darstellt (Prinz, Vollmer et al. 1999, Nickoloff, Bonish et al. 2000, Vollmer, Menssen et al. 2001) und bei anderen autoimmunen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Rheumatoiden Arthritis (Yen, Moore et al. 2001), KIR-positive CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T-Zellen gefunden wurden, wurde im Zuge dieser Arbeit die Frequenz von peripheren KIR<sup>+</sup> T-Zellen bei Psoriasis-Patienten untersucht. Es lagen leider keine Gewebeproben aus der Haut vor, aus denen die Zellen isoliert hätten werden können, weshalb diese T-Zellpopulation nur im Blut von Psoriasis-Patienten untersucht werden konnte.



**Abb. 39 KIR-Expression auf peripheren T-Zellen bei Psoriasis-Patienten im Vergleich zu Normalspendern**  
 Färbung von PBMC isoliert aus Psoriasis-Patienten und Normalspendern mit CD3, p58.1 (KIR2DL/S1), p58.2 (KIR2DL/S2), p70 (KIR3DL1) und p50.3 (KIR2DS4) Antikörpern. Gegatet auf CD3<sup>+</sup> Lymphozyten. Analyse des prozentualen Anteils der KIR<sup>+</sup> T-Zellen bezogen auf die gesamte Anzahl der T-Zellen. PBMC PSO n=23, PBMC NS n=13. Die Linie markiert den Mittelwert (MW). mAK: monoklonale Antikörper – erkennen inhibierende und aktivierende KIR-Isoformen, STABWN: Standardabweichung

Die monoklonalen Antikörper gegen die KIR2D1- bzw. KIR2D2-Rezeptoren können nicht zwischen den langen inhibierenden und den kurzen aktivierenden Isoformen unterscheiden, da deren extrazelluläre Domänen identisch sind. Daher sind die Daten als KIR2DL/S1 und KIR2DL/S2 angegeben. Der prozentuale Anteil von KIR-positiven T-Zellen an den peripheren T-Zellen von Psoriasis-Patienten unterscheidet sich nicht signifikant von dem der Normalspender (KIR2DL/S1  $p=0,4$ , KIR2DL/S2  $p=0,9$ , KIR3DL1  $p=0,9$ , KIR2DS4  $p=1,0$ ) (Abb. 39), wobei in beiden Gruppen alle T-Zellen zum  $CD3^+CD8^+$  zytotoxischen T-Zell-Phänotyp gehören. Im Blut der Psoriasis-Patienten liegen also nicht mehr  $KIR^+$  T-Zellen vor, welche in die Haut einwandern und dort das autoimmune Zytokinmilieu vermitteln könnten. Um dies jedoch genauer zu klären, müssten Gewebeproben aus der Haut genommen und die dort infiltrierenden T-Zellen untersucht werden. Da auch die Auswertung weiterer 15 NK- und T-Zellmarker in PBMC von Psoriasis-Patienten gegenüber Normalspendern keine signifikanten Unterschiede ergab, wurde auf die ausführliche Beschreibung an dieser Stelle verzichtet. Dieser Befund unterstreicht jedoch die große Bedeutung des Mikromilieus im entsprechenden Gewebe für die Analyse der autoimmunen Prozesse, die sich offensichtlich nur selten in der Peripherie nachweisen lassen.

**Zusammenfassend lässt sich aus den Untersuchungen an PBMC von Psoriasis-Patienten feststellen, dass mit dem CD6-Marker auch in diesem Kollektiv in der Peripherie ein signifikanter Unterschied zu den gesunden Kontrollspendern detektiert werden konnte, da die CD6-Expression auf den  $CD56^{dim}$  NK-Zellen signifikant erniedrigt ist. Dies unterstreicht die Bedeutung des CD6-Markers für die Charakterisierung der NK-Zell-Subpopulationen im autoimmunen Kontext.**

## 5 Genetische Assoziationen des HLA-C- und KIR-Lokus mit Autoimmunkrankheiten

### 5.1 HLA- und KIR-Assoziation bei Psoriasis vulgaris

Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen scheint auch bei Psoriasis-Patienten eine genetische Prädisposition aufzutreten, nämlich das Vorhandensein bestimmter NK-Rezeptoren in Kombination mit bestimmten HLA-Klasse-I-Allelen. Bei Psoriasis ist seit Jahrzehnten eine starke Assoziation mit *HLA-Cw6* bekannt (Tiilikainen, Lassus et al. 1980, Mallon, Bunce et al. 1997), deren Ursprung bis zur Entdeckung der HLA-C-KIR-Interaktion vollkommen unklar war, und erst dadurch wieder in das Zentrum des Interesses gerückt ist. Die genetische Assoziation ist also eine Kombination aus HLA-C und den KIR-Genen. Bei Psoriasis vulgaris liegt laut Literatur eine genetische Prädisposition vorwiegend mit dem aktivierenden Rezeptor KIR2DS1 vor, dem Rezeptor für HLA-Cw6 (Luszczek, Manczak et al. 2004). Auch bei Patienten mit Psoriasis Arthritis wird eine genetische Prädisposition für KIR2DS2 und KIR2DS1 in Abwesenheit bestimmter HLA-C-Allele beschrieben (Martin, Nelson et al. 2002, Williams, Meenagh et al. 2005). Da der KIR-Genlocus auf Chromosom 19q13.4 neben dem MHC-Komplex zu den extrem polymorphen Genregionen zählt, bietet sich eine Kombination dieser beiden Genorte an. Dabei werden zunächst die HLA-C-Allele jedes Individuums in die beiden Gruppen C1 und C2 zugeordnet, so dass für jeden Patienten die Definition seiner individuellen C1/C1, C2/C2 oder C1/C2 Kombination möglich ist. Für den KIR-Lokus existieren zwei Haupt-Haplotypen, A und B, wobei Haplotyp A durch das Fehlen der aktivierenden KIR-Gene KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS5 und KIR3DS1 charakterisiert ist, bzw. nur der aktivierende KIR2DS4 exprimiert wird. Haplotyp B stellt die „Vollausstattung“ mit aktivierenden und inhibierenden KIR-Genen dar, wobei B-Haplotypen auch einzelne aktivierende KIR fehlen können (Vgl. Abb. 59, Anhang S.158). Um diese genetischen Prädispositionen auch in dem hier untersuchten Patientenkollektiv zu untersuchen, wurden HLA-C- und KIR-Typisierungen der Patienten durchgeführt. Dazu wurde aus PBMC genomische DNS isoliert und die Genregionen wie unter 7.2 (Methoden, S.53) beschrieben typisiert. Die Rohdaten der HLA-C- und KIR-Typisierungen sind in Tab. 16 (Anhang, S.159) und Tab. 18 (Normalspender, Anhang, S.161) dargestellt.

18 der 41 typisierten Psoriasis-Patienten besitzen das HLA-Cw\*06 Allel (siehe Tab. 16, Anhang, S.159), was einer Frequenz von 44 % entspricht. Die in dieser Arbeit typisierten Normalspender besitzen eine HLA-Cw\*06-Frequenz von 31 %, welche aufgrund der geringen Spenderzahl jedoch nicht aussagekräftig ist. Laut der „allele frequencies“-Datenbank beträgt die Frequenz von HLA-Cw\*06 in einer Westeuropäischen Population von gesunden Normalspendern nur 16-20 % (www.allele-frequencies.net), eine weitere große Studie von Normalspendern ergab eine Frequenz von 14 % (Becker, Tonn et al. 2003) (Rohdaten selbst ausgewertet), d.h. die Häufigkeit des HLA-Cw\*06-Allels in dem hier untersuchten Patientenkollektiv ist im Vergleich um mehr als das Zweifache erhöht. Dieses Ergebnis bestätigt eindrucksvoll die genetische Assoziation mit HLA-Cw\*06 bei Psoriasis vulgaris Patienten. HLA-Cw6 gehört zur C2-Gruppe und die hohe Cw6-Frequenz kann somit zur hohen Anzahl der C1/C2 heterozygoten Individuen beitragen. Tatsächlich besitzen 51 % der Psoriasis-Patienten C1/C2, 20 % sind C2/C2 und nur 29 % sind homozygot C1/C1. Diese Werte unterscheiden sich jedoch nicht von den hier untersuchten Normalspendern (C1/C2=62%, C2/C2=23 %, C1/C1=15 %). Eine große Kontrollstudie mit 163 Spendern ergab ebenfalls ähnliche Frequenzen von 47 % C1/C2, 14 % C1/C2 und 39 % C1/C1 (Becker, Tonn et al. 2003) (eigene Auswertung der Rohdaten), wobei hier C1/C1 höhere Frequenzen zeigt, als bei den in dieser Arbeit durchgeführten Typisierungen.

Psoriasis vulgaris Patienten n=41				Normalspender n=13			
	HLA-Cw homozygot		HLA-Cw heterozygot		HLA-Cw homozygot		HLA-Cw heterozygot
	C1/C1	C2/C2	C1/C2		C1/C1	C2/C2	C1/C2
	12	8	21		2	3	8
HLA-Cw*06		7	11	HLA-Cw*06		1	3

**Abb. 40 HLA-C Gruppen und HLA-Cw\*06-Frequenz der Psoriasis-Patienten und Normalspender**

Gezeigt ist die Einteilung der HLA-Cw-Moleküle in die C1- und C2-Gruppen. Die C1-Gruppe besitzt an Aminosäureposition 80 ein Asparagin und stellt die Liganden für KIR2DL/S2 und KIR2DL/S3 dar. Die Moleküle der C2-Gruppe besitzen an Aminosäureposition 80 ein Lysin und sind Liganden für KIR2DL/S1. Heterozygote C1/C2 Individuen exprimieren somit beide HLA-C Allele und können mit KIR2DL/S1-3 interagieren.

Neben HLA-Cw\*06 ist bei Psoriasis vulgaris außerdem eine genetische Assoziation mit KIR2DS1, dem Rezeptor für HLA-Cw6, publiziert (Luszczek, Manczak et al. 2004, Suzuki, Hamamoto et al. 2004), welche auch bei Psoriasis Arthritis bekannt ist (Martin, Nelson et al.

2002). Interessanterweise besitzen nur 11 der hier typisierten Patienten dieses Gen, was einer Frequenz von 27 % entspricht, und damit den publizierten Daten von 85 % deutlich widerspricht (Luszczek, Manczak et al. 2004) und mit der HLA-Cw\*06 Frequenz der Normalspender (31 %) übereinstimmt. In einem publizierten Normalspender-Kollektiv betrug die Frequenz des KIR2DS1 Gens 39,4 % (Becker, Tonn et al. 2003). Die hier untersuchten Psoriasis-Patienten haben also sogar eine verringerte Frequenz an KIR2DS1 und die genetische Assoziation mit diesem Gen konnte nicht bestätigt werden. Das Vorhandensein und die Anzahl der KIR-Gene variiert zwischen verschiedenen Haplotypen (siehe Tab. 16, Anhang, S.159). Die so genannten Framework KIR-Gene (3DL3, 3DP1, 2DL4 und 3DL2) sind bei jedem Haplotyp vorhanden. Die Einteilung der Haplotypen in die zwei Gruppen A und B folgt hauptsächlich über das Vorhandensein oder das Fehlen von aktivierenden KIR-Genen. Haplotyp A beinhaltet 6 inhibierende KIR Gene (2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL1, 3DL2 und 3DL3) und nur ein aktivierendes KIR Gen (KIR2DS4). Die Sequenz des KIR2DS4 Gens kann eine Deletion aufweisen, es liegt dann ein Nullallel vor, welches nicht exprimiert wird. Dieser Haplotyp exprimiert also gar keinen aktivierenden KIR auf NK-Zellen und wird hier als A $\Delta$  bezeichnet. Haplotyp B beinhaltet eine Vielzahl an Kombinationen aus aktivierenden und inhibierenden KIR Genen. 44 % der Psoriasis-Patienten (n=41) besitzen Haplotyp A/A, 32 % sind homozygot für Haplotyp A $\Delta$  und besitzen somit gar keinen aktivierenden KIR und 12 % der Patienten exprimieren den aktivierenden KIR2DS4 (7 % Haplotyp A $\Delta$ /A, 5 % Haplotyp A/A). 41 % der Patienten besitzen mehr als einen aktivierenden KIR, da sie den Haplotyp A/B besitzen und 15 % haben mehr als drei aktivierende KIR in ihrem KIR-Lokus, da sie den Haplotyp B/B besitzen. Die in dieser Arbeit typisierten Normalspender weisen eine Frequenz von 15 % für A $\Delta$ /A $\Delta$ , 23 % A $\Delta$ /A, 0 % A/A, 54 % A/B und 8 % B/B auf, wobei auch an dieser Stelle wieder auf die geringe Spenderzahl hingewiesen werden muss. Becker et al beschreiben in ihrer Studie eine Haplotyp A-Frequenz von 31 %, wobei sich dieser aus 2 % A $\Delta$ /A $\Delta$ , 8 % A $\Delta$ /A und 21 % A/A zusammensetzt (Becker, Tonn et al. 2003) (Rohdaten selbst ausgewertet). Interessanterweise findet man bei den Psoriasis-Patienten eine starke Erhöhung der A $\Delta$ /A $\Delta$ -Frequenz, was ein Fehlen von aktivierenden KIR bedeutet. Bisherige Untersuchungen postulieren jedoch eine Assoziation mit den aktivierenden KIR2DS2 und KIR2DS1 in Abwesenheit bestimmter HLA-C-Allele (Martin, Nelson et al. 2002, Williams, Meenagh et al. 2005).

„Gradient“ für aktivierende KIR		0 kein akt. KIR AΔ/AΔ	1 ein akt. KIR (2DS4) AΔ/A, A/A	>1 mehr als ein akt. KIR A/B	>3 mehr als drei akt. KIR B/B
<b>Psoriasis-Patienten (n=41)</b>	n	13	3/2	17	6
	Frequenz (%)	32	7/5	41	15
<b>Normalspender (n=13)</b>	n	2	3/0	7	1
	Frequenz (%)	15	23/0	54	8

**Abb. 41 Frequenz der KIR-Haplotypen bei Psoriasis-Patienten und Normalspendern**

Dargestellt ist die Frequenz der KIR-Haplotypen der Psoriasis-Patienten (n=41) und der Normalspender (n=13). Haplotyp AΔ/AΔ besitzt keinen aktivierenden KIR, da das KIR2DS4-Nullallel vorliegt. Die Haplotypen AΔ/A und A/A besitzen den aktivierenden KIR2DS4. Haplotyp A/B beinhaltet mehr als einen aktivierenden KIR, da zusätzlich zu KIR2DS4 noch weitere aktivierende KIR-Gene vorliegen, und Haplotyp B/B besitzt mehr als drei aktivierende KIR, da eine Vielzahl an aktivierenden KIR vorliegen kann.

Vor allem bei der Regulation von NK-Zellen spielen die KIR-Rezeptoren eine wichtige Rolle. Um die funktionellen Auswirkungen auf die Regulation von NK-Zellen zu untersuchen, muss jedoch immer die Kombination aus HLA-C und KIR-Molekülen betrachtet werden. So wurde z.B. für Psoriasis Arthritis eine genetische Prädisposition der aktivierenden KIR2DS2 und KIR2DS1 in gleichzeitiger Abwesenheit der Liganden für ihre homologen inhibierenden KIR-Rezeptoren, C1 bzw. C2 gezeigt (Martin, Nelson et al. 2002). Diese Situation kann theoretisch zu einer Aktivierung der NK-Zelle führen, da die inhibierenden Signale fehlen (Vgl. Abb. 9, Einleitung S.19). In dieses Schema würden also Patienten mit dem KIR-Haplotyp A/B und B/B fallen, da diese außer KIR2DS4 mehr als einen aktivierenden KIR besitzen und NK-Zellen diese Rezeptoren auch exprimieren. Fallen diese Patienten in eine homozygote HLA-C-Haplotypgruppe, so erhöht das die Wahrscheinlichkeit, dass keine Liganden für diese inhibierende KIR vorhanden sind. Die Auswertung der HLA-C Haplotypen in Kombination mit den KIR-Haplotypen ergab jedoch, dass nur 9 (5+2+2) der untersuchten Psoriasis vulgaris-Patienten (22 %) diese Kombination aufweisen (Abb. 42, grau unterlegt). Bei Normalspendern besitzen 23 % diese Kombination, weshalb entgegen den publizierten Daten keine Assoziation mit dieser Konstellation und dem autoimmunen Kontext vorliegt.

Psoriasis vulgaris-Patienten n=41					Normalspender n=13				
HLA-C Haplotyp		HLA-Cw homozygot		HLA-Cw heterozygot	HLA-C Haplotyp		HLA-Cw homozygot		HLA-Cw heterozygot
		C1/C1	C2/C2	C1/C2			C1/C1	C2/C2	C1/C2
KIR Haplotyp	kein akt. KIR AΔ/AΔ	3	4	6	KIR Haplotyp	kein akt. KIR AΔ/AΔ		1	1
	ein akt. KIR (2DS4) AΔ/A, A/A	2	2	2		ein akt. KIR (2DS4) AΔ/A, A/A		1	2
	mehr als ein akt. KIR, A/B	5	2	9		mehr als ein akt. KIR, A/B	2	1	4
	mehr als drei akt. KIR, B/B	2		4		mehr als drei akt. KIR, B/B			1

**Abb. 42 HLA-C- und KIR-Kombinationen bei Psoriasis vulgaris-Patienten**

Ausgewertet wurde die Kombination aus den HLA-C- und den KIR-Haplotypen, da die KIR-Rezeptoren nur funktionell sein können, wenn ihre entsprechenden Liganden vorhanden sind. Liegt ein heterozygoter C1/C2 Haplotyp vor, so finden alle inhibierenden Rezeptoren ihre Liganden. Die NK-Zelle wird also, unabhängig davon ob aktivierende Rezeptoren vorhanden sind, inhibiert. Liegt ein homozygoter HLA-C Haplotyp in Kombination mit dem A-Haplotyp von KIR vor, so findet zwar nicht jeder inhibierende Rezeptor seinen Liganden, die NK-Zelle befindet sich aber trotzdem in einem Ruhezustand, da außer KIR2DS4 die aktivierenden Rezeptoren bei Haplotyp A vollständig fehlen. Liegt jedoch nur eine HLA-C Gruppe in Kombination mit einem B-Haplotyp von KIR vor, so besteht die Möglichkeit, dass Liganden für inhibierende Rezeptoren fehlen und die NK-Zelle aktiviert wird (grau unterlegt).

## 5.2 HLA- und KIR-Assoziation bei Rheumatoider Arthritis

Bei Rheumatoider Arthritis wurden Assoziationen mit verschiedenen HLA-DR Molekülen beschrieben, welche ein gemeinsames Epitop zwischen Aminosäure 70 und 74 besitzen (Nepom, Byers et al. 1989). Auf diese Assoziation wurde in dieser Arbeit nicht eingegangen, da in Bezug auf NK-Zellen nur die HLA-C Moleküle als Liganden der KIR-Rezeptoren eine Rolle spielen und Rezeptoren für HLA-Klasse-II-Moleküle nicht bekannt sind. Bei Rheumatoider Arthritis wurden außerdem, wie bei Psoriasis, KIR-positive CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-Zellen beschrieben, welche vorwiegend den aktivierenden KIR2DS2 exprimieren (Yen, Moore et al. 2001). Eine erhöhte Frequenz KIR<sup>+</sup> T-Lymphozyten bei Rheumatoiden Arthritis-Patienten im Vergleich zu Normalspendern konnte in meiner Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es liegen einige widersprüchliche Veröffentlichungen bezüglich einer KIR-Assoziation vor, wobei in einer Studie einer Taiwanesischen Population eine erhöhte Frequenz von KIR2DS4 postuliert wurde, welche mit der Anwesenheit des Liganden HLA-Cw4 zusammenhängt (Yen, Lin et al. 2006). Hierbei muss beachtet werden, dass die KIR2DS4-Frequenz des Normalspenderkollektivs, welche normalerweise ca. 90 % beträgt (Becker, Tonn et al. 2003), in dieser Studie sehr gering war (59,4 %) und deshalb die erhöhte KIR2DS4 Frequenz bei den Patienten zustande kommen kann. Diese Vermutung unterstreicht eine Untersuchung Nordirischer Patienten, durch welche keine Assoziation mit KIR-Rezeptoren festgestellt werden konnte (Middleton, Meenagh et al. 2007). Eine weitere Studie zeigt ebenfalls, dass die KIR-Frequenzen von Rheumatoiden



Arthritis-Patienten denen von Normalspendern entsprechen (Majorczyk, Pawlik et al. 2007), jedoch konnte hier gezeigt werden, dass die Frequenzen für KIR2DS1 und KIR3DS1 in den Patienten geringer waren, die keinen Knochenverschleiß aufwiesen und dass KIR2DL2 und KIR2DS2 in Patienten, bei denen sich die Entzündung auch außerhalb der Gelenke manifestiert (Rheumatoide Vaskulitis), erhöht vorkommen. Die Expression des aktivierenden KIR2DS2 konnte auch schon in einer anderen Publikation mit einem erhöhten Risiko für Rheumatoide Vaskulitis korreliert werden (Yen, Moore et al. 2001). Um die KIR- und HLA-C-Assoziationen in meinem Kollektiv zu untersuchen, wurden die HLA-C-Moleküle in die Gruppen C1/C1, C1/C2 und C2/C2 und die KIR-Haplotypen in A und B eingeteilt. Die Rohdaten der Typisierungen sind in Tab. 17 (Anhang, S.160) und Tab. 18 (Normalspender, Anhang, S.161) gezeigt. Da das Arthritis-Patientenkollektiv verschiedene Krankheiten enthielt, wurden hier nur die eindeutig diagnostizierten autoimmunen Rheumatoiden Arthritis-Patienten (SYN#03, 05, 08, 09, 11-14, 20, 22, 24) bezüglich der genetischen Assoziationen untersucht, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen.

Rheumatoide Arthritis-Patienten n=11				Normalspender n=13			
	HLA-Cw homozygot		HLA-Cw heterozygot		HLA-Cw homozygot		HLA-Cw heterozygot
	C1/C1	C2/C2	C1/C2		C1/C1	C2/C2	C1/C2
	5	1	5		2	3	8
HLA-Cw*06		1	2	HLA-Cw*06		1	3

**Abb. 43 HLA-C-Gruppen und HLA-Cw\*6-Frequenz der Rheumatoiden Arthritis-Patienten und Normalspendern**  
Gezeigt ist die Einteilung der HLA-Cw-Moleküle in die C1- und C2-Gruppen. Die C1-Gruppe besitzt an Aminosäureposition 80 ein Asparagin und stellt die Liganden für KIR2DL/S2 und KIR2DL/S3 dar. Moleküle der C2-Gruppe besitzen an Aminosäureposition 80 ein Lysin und sind Liganden für KIR2DL/S1. Heterozygote C1/C2 Individuen exprimieren somit beide HLA-C-Allele und können mit allen KIR interagieren.

Die Frequenz von HLA-Cw\*06 beträgt bei Rheumatoiden Arthritis-Patienten, wie bei den Psoriasis-Patienten, 27 % und unterscheidet sich nicht von der Frequenz bei Normalspendern (31 %). 45,5 % der RA-Patienten besitzen C1/C2 oder C1/C1 und 9 % sind homozygot C2/C2. Im Vergleich zu den Psoriasis-Patienten (51 % C1/C2, 29 % C1/C1) und den Normalspendern (62 % C1/C2, 15 % C1/C1) ist hier die C1-Gruppe tendenziell stärker repräsentiert. In einer großen Studie wurden jedoch auch 47 % C1/C2 und 39 % C1/C1 Zuordnungen gefunden (Becker, Tonn et al. 2003) (Rohdaten selbst ausgewertet). Alle der

hier untersuchten Rheumatoiden Arthritis-Patienten besitzen das KIR2DS4-Gen, wobei dies ebenfalls bei den Normalspendern der Fall ist. Wie in Abb. 44 zu sehen ist, können 27 % der Patienten dennoch kein KIR2DS4 auf NK-Zellen exprimieren, da sie zum KIR-Haplotyp AΔ/AΔ gehören. Bei Normalspendern zählen nur 15 % zu diesem Haplotyp, wobei Becker et al. in ihrer Studie sogar nur eine Frequenz von 2 % für AΔ/AΔ zeigen (Becker, Tonn et al. 2003) (Rohdaten selbst ausgewertet). Da im Vergleich dazu auch bei den Psoriasis-Patienten eine erhöhte Frequenz von KIR2DS4 auftritt (32 %), könnte dieser aktivierende KIR mit einem autoimmunen Kontext in Zusammenhang gebracht werden. Die Assoziationen mit KIR2DS1, KIR3DS1, KIR2DL2 und KIR2DS2 in Bezug auf den Grad der Knochenschädigung und einer bestehenden Vaskulitis konnten in dieser Arbeit nicht analysiert werden, da die entsprechenden Informationen zu dem Patientenkollektiv nicht vorlagen.

„Gradient“ für aktivierende KIR		0 kein akt. KIR AΔ/AΔ	1 ein akt. KIR (2DS4) AΔ/A, A/A	>1 mehr als ein akt. KIR A/B	>3 mehr als drei akt. KIR B/B
<b>Rheumatoide Arthritis-Patienten (n=11)</b>	n	3	1/0	7	0
	Frequenz (%)	27	9/0	64	0
<b>Normalspender (n=13)</b>	n	2	3/0	7	1
	Frequenz (%)	15	23/0	54	8

**Abb. 44 Frequenz der KIR-Haplotypen bei Rheumatoide Arthritis-Patienten und Normalspendern**

Dargestellt ist die Frequenz der KIR-Haplotypen der Rheumatoiden Arthritis-Patienten (n=11) und der Normalspender (n=13). Haplotyp AΔ/AΔ exprimiert keinen aktivierenden KIR, da das KIR2DS4-Nullallel vorliegt. Die Haplotypen AΔ/A und A/A exprimieren den aktivierenden KIR2DS4. Haplotyp A/B exprimiert mehr als einen aktivierenden KIR, da zusätzlich zu KIR2DS4 noch weitere aktivierende KIR-Gene vorliegen, und Haplotyp B/B exprimiert mehr als drei aktivierende KIR, da eine Vielzahl an aktivierenden KIR vorliegen kann.

Die Auswertung der KIR-Haplotypen in Kombination mit den HLA-C-Haplotypen ergab, dass 4 (3+1) der Rheumatoiden Arthritis-Patienten (36%) die tendenziell „aktivierende“ Kombination von HLA-C- und KIR-Molekülen besitzt (Abb. 45, grau unterlegt), wie sie bei Psoriasis vulgaris postuliert wurde (Martin, Nelson et al. 2002). Dies würde einer tendenziellen Erhöhung gegenüber den Normalspendern entsprechen (23 %). Die geringe Patientenzahl darf bei der Analyse dieser Ergebnisse jedoch nicht außer Acht gelassen werden, da bei einer großen Kontrollstudie 39 % der Normalspender in diese Gruppe fallen (Becker, Tonn et al. 2003) (Rohdaten selbst ausgewertet).

Rheumatoide Arthritis-Patienten n=11					Normalspender n=13				
HLA-C Haplotyp		HLA-Cw homozygot		HLA-Cw heterozygot	HLA-C Haplotyp		HLA-Cw homozygot		HLA-Cw heterozygot
		C1/C1	C2/C2	C1/C2			C1/C1	C2/C2	C1/C2
KIR Haplotyp	kein akt. KIR AΔ/AΔ	2		1	KIR Haplotyp	kein akt. KIR AΔ/AΔ		1	1
	ein akt. KIR (2DS4) AΔ/A, A/A			1		ein akt. KIR (2DS4) AΔ/A, A/A		1	2
	mehr als ein akt. KIR, A/B	3	1	3		mehr als ein akt. KIR, A/B	2	1	4
	mehr als drei akt. KIR, B/B					mehr als drei akt. KIR, B/B			1

**Abb. 45 HLA-C- und KIR-Kombinationen bei Psoriasis vulgaris-Patienten**

Ausgewertet wurden die Kombinationen aus den HLA-C- und KIR-Haplotypen, da die KIR-Rezeptoren nur funktionell sein können, wenn ihre entsprechenden Liganden vorhanden sind. Liegt ein heterozygoter C1/C2 Haplotyp vor, so finden alle inhibierenden Rezeptoren ihre Liganden. Die NK-Zelle wird also, unabhängig davon ob aktivierende Rezeptoren vorhanden sind, inhibiert. Liegt ein homozygoter HLA-C-Haplotyp in Kombination mit dem A-Haplotyp von KIR vor, so findet zwar nicht jeder inhibierende Rezeptor seinen Liganden, die NK-Zelle befindet sich aber trotzdem in einem Ruhezustand, da außer KIR2DS4 die aktivierenden Rezeptoren bei Haplotyp A vollständig fehlen. Liegt jedoch nur eine HLA-C Gruppe in Kombination mit einem B-Haplotyp von KIR vor, so besteht die Möglichkeit, dass Liganden für inhibierende Rezeptoren fehlen und die NK-Zelle aktiviert wird.

Aus diesen Daten kann man zusammenfassen, dass einerseits die publizierten genetischen Assoziationen zum Teil nicht bestätigt wurden, wobei die geringe Probengröße, vor allem bei den Rheumatoide Arthritis-Patienten, für die Diskrepanz verantwortlich sein könnte. Andererseits deuten die Befunde dennoch darauf hin, dass auch bei den hier untersuchten Autoimmunerkrankungen die Kombination der unabhängig voneinander vererbten KIR- und HLA-C-Gene im Vergleich zu gesunden Normalspendern verschoben ist.

## F Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten zunächst, dass das synoviale Repertoire bezüglich der beiden NK-Subpopulationen  $CD16^- CD56^{bright}$  und  $CD16^+ CD56^{dim}$ , in entzündlichen Gelenkerkrankungen im Vergleich zur Peripherie umgekehrt ist, wobei sich die NK-Zell-Populationen zwischen Arthritis- und Arthrose-Patienten nicht signifikant unterscheiden. Schon in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die  $CD16^- CD56^{bright}$  NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten dominieren und die  $CD16^+ CD56^{dim}$  NK-Zellen nahezu vollständig fehlen (Dalbeth and Callan 2002, Pridgeon, Lennon et al. 2003, de Matos, Berg et al. 2007). In meiner Arbeit konnte ich erstmals zeigen, dass der Marker CD6 einen differentiellen Marker auf  $CD16^+ CD56^{dim}$  NK-Zellen darstellt und dass die synovialen NK-Zellen CD6-negativ sind. Im Gegensatz zu diesem identischen Phänotyp des zellulären Infiltrats bezüglich der NK-Zellen, weist das Zytokin/Chemokinmilieu große Unterschiede zwischen Arthritis- und Arthrose-Patienten auf. Aus den umfangreichen Statistiken der 50 Parameter konnten „Leit“-Zytokine definiert, und das autoimmune Zytokinmuster (Arthritis) von einem nicht-autoimmunen (Arthrose) deutlich unterschieden werden.

### 1 Die Dominanz der $CD56^{bright} CD6^-$ NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten

In den Synovialflüssigkeiten der Arthritis- und Arthrose-Patienten liegt eine Dominanz der  $CD56^{bright} CD16^- CD6^-$  NK-Zell-Population gegenüber den  $CD56^{dim} CD16^+ CD6^+$  NK-Zellen vor. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Infiltration wesentlich stärker mit der Abwesenheit des CD6-Markers als mit der  $CD56^{bright}$  oder der fehlenden CD16-Expression korreliert. Dieser neue Befund meiner Arbeit bezüglich der Infiltration der  $CD56^{bright}$  NK-Zellen bestätigt publizierte Ergebnisse, liefert aber durch den CD6-Marker in Bezug auf die kontroverse Diskussion der Beziehung der beiden NK-Zell-Populationen zueinander ein wichtiges Argument für die selektive Infiltration der  $CD56^{bright}$  NK-Zellen und damit gegen die Differenzierung der  $CD56^{dim}$  in  $CD56^{bright}$  NK-Zellen.

Bis jetzt ist die Entwicklung der NK-Zellen und die Verwandtschaft der beiden Subpopulationen nicht eindeutig geklärt, da mehrere kontroverse Hypothesen darüber bestehen. Einerseits wird ein gemeinsamer NK-Zell-Vorläufer im Knochenmark diskutiert,

welcher sich durch unterschiedliche Signale in CD56<sup>bright</sup> oder CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen entwickeln kann. Andererseits besteht auch die Möglichkeit unterschiedlicher Vorläufer-Zellen für diese beiden NK-Zell-Subpopulationen. Außerdem wurde postuliert, dass CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK-Zellen die Vorläufer der CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK-Zellen darstellen können, aber auch umgekehrt, dass sich diese selbst aus den CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK-Zellen entwickeln können (Loza and Perussia 2004, Freud, Becknell et al. 2005, Mailliard, Alber et al. 2005, Romagnani, Juelke et al. 2007). Neben der Entwicklung ist auch die Funktion von CD56 noch nicht vollständig bekannt, wobei es Hinweise gibt, dass es in der neuronalen Entwicklung beteiligt ist und eine homophile Adhäsion zwischen NK-Zellen vermittelt (Nitta, Yagita et al. 1989). Darüber hinaus können NK-Zellen über CD56 heterophile Bindungen mit anderen Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten eingehen (Chan, Hong et al. 2007). In diesem Kontext ist CD56 ein Ligand für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptor FGFR1, der konstitutiv auf Fibroblasten, sowohl membrangebunden als auch in sezernierter Form, exprimiert ist (Root and Shipley 2000). Chan et al postulierten, dass periphere CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen durch den Kontakt mit synovialen Fibroblasten über FGFR1 in CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen differenzieren können (Chan, Hong et al. 2007), wobei in dieser Analyse nicht das gesamte Repertoire der NK-Rezeptoren untersucht wurde. Eine weitere Hypothese ist, dass die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen nach einer Änderung ihres Chemokinrezeptorrepertoires den Ort der Entzündung oder das lymphoide Gewebe wieder verlassen, was dort dann zu der beschriebenen CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Dominanz führen würde. Die Differenzierung durch Fibroblastenkontakt ist jedoch noch nicht für synoviale NK-Zellen gezeigt, da diese Untersuchungen zwar mit synovialen Fibroblasten, aber nur mit peripheren NK-Zellen durchgeführt wurden. Im Gegensatz dazu postulieren Loza et al, dass eine zytokinvermittelte Differenzierung von CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen in CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen stattfindet (Loza and Perussia 2004), wobei ein wirklicher Differenzierungsmarker für NK-Zellen auch in dieser Arbeit nicht identifiziert wurde. Die variable Expression von CD56 lässt dieses Molekül nicht als Infiltrationsmarker zu, da sie sich auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen nach *in vitro* oder *in vivo* Aktivierung erhöht (Robertson, Caligiuri et al. 1990, Robertson, Soiffer et al. 1992, Caligiuri, Murray et al. 1993, Robertson, Cameron et al. 1999). Die Dichte von CD56 auf der Oberfläche von NK-Zellen kann also nicht dazu verwendet werden um unstimulierte CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen von aktivierten CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zu unterscheiden. CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen dominieren zwar in der Synovialflüssigkeit auch in meinen Proben, es sind aber auch zu einem geringeren Anteil CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen vorhanden. Neben der Expression von CD56 unterscheiden sich die NK-Zell-Subpopulationen auch in der Expression von CD16 (Lanier, Le et al. 1986), wobei CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen meistens CD16

negativ und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen CD16-positiv sind. Obwohl CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Regel kein CD16 exprimieren, wurden in den Synovialflüssigkeiten der Arthritis-Patienten dennoch viele CD16-positive NK-Zellen gefunden, die zwar nur einen sehr geringen Anteil der synovialen NK-Zellen darstellen, aber deren erhöhte CD56-Expression eine Folge der Aktivierung sein könnte (Robertson, Caligiuri et al. 1990). Neuere Untersuchungen zeigen, dass nicht nur auf CD16-positiven NK-Zellen die CD56-Expression erhöht werden kann, sondern dass auch CD56<sup>dim</sup> CD16-negative NK-Zellen nach Aktivierung ihre CD16-Expression erhöhen können (Chan, Hong et al. 2007). Ferlazzo et al haben gezeigt, dass CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen aus Lymphknoten und Mandeln nach einer einwöchigen IL-2 Stimulation CD16 und sogar KIR exprimieren können (Ferlazzo, Thomas et al. 2004). Dieser Effekt von IL-2 konnte sogar auf peripheren CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nachgewiesen werden (Romagnani, Juelke et al. 2007), wobei diese Experimente technisch auf Grund der Sortierungsproblematik umstritten sind.

Die KIR-Expression fehlte auf den in meiner Arbeit untersuchten synovialen NK-Zellen im Vergleich zu den peripheren CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen wie erwartet vollständig. Da es sich laut Literatur bei synovialen NK-Zellen um einen aktivierten Phänotyp handeln soll, der mit den Aktivierungsmarkern CD25 (hoch affiner IL-2 Rezeptor) und CD69 einhergeht (de Matos, Berg et al. 2007), besteht theoretisch die Möglichkeit, dass durch das lokale proinflammatorische Zytokinmilieu eine CD16-Expression auf der Oberfläche der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen induziert wurde. Diese Aktivierungshypothese erscheint im Lichte meiner umfassenden Phänotypanalyse und der Identifizierung des selektiven Infiltration-assoziierten Markers CD6, unwahrscheinlich. Da die Expression von CD56 und CD16 offensichtlich durch Aktivierung variierbar ist, erwiesen sich diese Marker als unzureichend für die Korrelation zwischen Phänotyp und Infiltration. In dieser Arbeit konnte dafür eine stabile und wesentlich signifikantere Korrelation zwischen synovialen NK-Zellen und der Abwesenheit von CD6 auf diesen Zellen gezeigt werden. CD6 ist ein Typ-B-Makrophagen-Scavenger-Rezeptor-Glykoprotein, und wird vor allem auf T-Zellen, Thymozyten und einigen B-Zellen exprimiert (Mayer, Funke et al. 1990, Aruffo, Bowen et al. 1997, Singer, Fox et al. 2002). Die Funktion von CD6 ist noch nicht vollständig geklärt, aber es wird als kostimulatorisches Molekül bei der T-Zell-Aktivierung (Morimoto, Rudd et al. 1988, Gangemi, Swack et al. 1989, Bott, Doshi et al. 1993, Osorio, Garcia et al. 1994, Singer, Richardson et al. 1996) und der Reifung von Thymozyten betrachtet (Wee, Wang et al. 1994, Patel, Wee et al. 1995). Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen. Auf T-Zellen scheint CD6 funktionell keine bedeutende Rolle zu spielen, da durch die

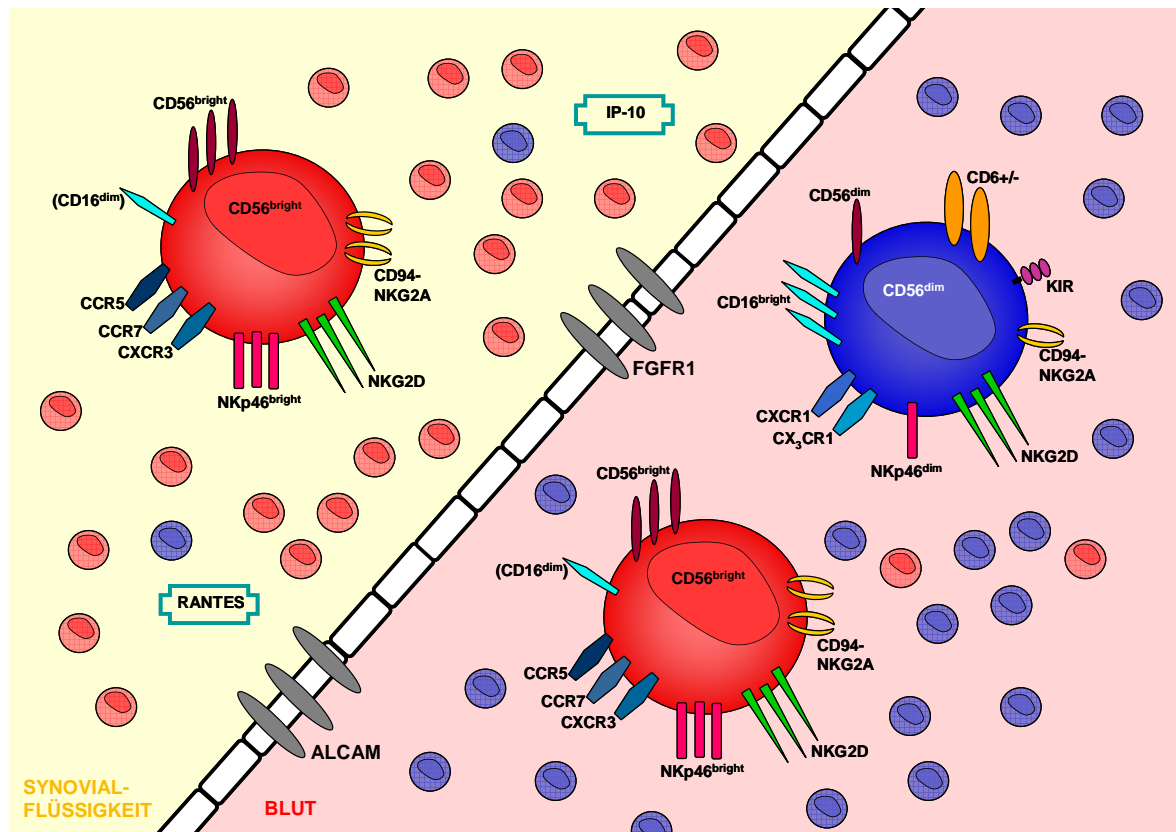
Stimulation von CD6 weder Zytokinproduktion noch zytotoxische Aktivität bei T-Zellen ausgelöst werden konnte. CD6 könnte jedoch bei der Migration von Immunzellen beteiligt sein, da es sich bei seinem Liganden ALCAM (CD166) um ein Adhäsionsmolekül handelt, das auf Endothelzellen, Monozyten und reifen DC exprimiert wird. Da die selektive CD6-Expression auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen bislang unbekannt war, ist seine NK-Funktion ebenfalls noch nicht geklärt. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass eine Stimulation von peripheren NK-Zellen mit einem gegen CD6 gerichteten Antikörper keine Zytotoxizität induziert. Die Rolle von CD6 für die Zytokinfreisetzung wird in der Arbeitsgruppe derzeit intensiv untersucht (Dissertation M.Braun). Über die CD6-ALCAM-Interaktion könnte aber eine Selektion der NK-Zellen bei der Infiltration ins Gewebe stattfinden, bei der die CD6<sup>+</sup> NK-Zellen im Synovialgewebe zurückgehalten werden. Die erste Analyse anhand frischen Synovialgewebes bestätigte diese Hypothese. Das Fehlen der CD6<sup>+</sup> NK-Zell-Fraktion ist die Folge eines geordneten Prozesses, denn bei einem Arthrose-Patienten wurden auch CD6-positive NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit gefunden. Diese Probe enthielt aber viele Erythrozyten als Folge einer operationsbedingten Einblutung, durch die die koordinierten Infiltrationsprozesse mit der Selektion der CD6-negativen NK-Zellen offensichtlich gestört wurden.

Durch die CD6-Expression lassen sich die NK-Zellen deutlich in zwei Subpopulationen einteilen, die sich natürlich auch in der Expression weiterer Rezeptoren unterscheiden. Die synovialen CD6<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimieren, ebenso wie die peripheren CD6<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, keine KIR, was mit funktionellen Konsequenzen bezüglich der HLA-Regulation verbunden ist. Auf NK-Zellen werden aktivierende und inhibierende KIR exprimiert, die über die Interaktion mit ihren Liganden, den HLA-C und HLA-Bw4 Molekülen, im Wesentlichen die NK-Zell-Aktivität regulieren (Long and Rajagopalan 2000, Bryceson, March et al. 2006). Ist der Ligand für einen aktivierenden KIR vorhanden und fehlt gleichzeitig der Ligand für den inhibierenden KIR, so überwiegen die Signale, welche zu einer Aktivierung der NK-Zelle und somit zu Zytotoxizität und Zytokinproduktion führen. Um zu verhindern, dass NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit nicht in einem permanent aktivierten Zustand vorliegen, müssen auch sie über negative Rezeptoren in ihrer Funktion inhibiert und reguliert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Frequenz des inhibierenden C-Typ-Lektin Rezeptors NKG2A, der immer als Heterodimer mit CD94 vorliegt, auf synovialen NK-Zellen im Vergleich zu peripheren NK-Zellen stark erhöht ist und somit die inhibitorische Aufgabe übernehmen könnte. NKG2A/CD94 erkennt das nicht klassische HLA-E-Molekül (Braud, Allan et al. 1998, Lee, Llano et al. 1998), wodurch es zu einer Inhibition der NK-Zell

Effektorfunktionen kommt. Neben NKG2A kann auch der aktivierende Rezeptor NKG2C mit CD94 ein Heterodimer bilden. Leider bestand in dieser Arbeit nicht die Möglichkeit die NKG2C-Expression auf synovialen NK-Zellen direkt zu untersuchen. Da CD94 auf nahezu allen NK-Zellen in Kombination mit NKG2A exprimiert wird, könnte demnach in der Synovialflüssigkeit die Frequenz der NKG2C<sup>+</sup> Zellen verringert sein. De Matos et al beschreiben jedoch eine ähnliche Verteilung von NKG2C<sup>+</sup> NK-Zellen in der Peripherie von Normalspendern und der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten (de Matos, Berg et al. 2007), und bestätigen also die Vermutung einer dezimierten NKG2C-Expression auf synovialen NK-Zellen nicht.

Einer der wichtigsten aktivierenden NK-Rezeptoren stellt NKG2D dar. Dieser Rezeptor ist wie zu erwarten auf nahezu allen synovialen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, wie auf allen anderen NK-Zellen exprimiert, und stellt somit das Gleichgewicht zwischen den aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren her. Damit konnten in meiner Arbeit bereits publizierte Befunde, die beschreiben, dass NKG2D auf synovialen NK-Zellen durch permanenten Kontakt mit NKG2D-Liganden-positiven Synoviozyten herabreguliert wird, nicht bestätigt werden (Groh, Bruhl et al. 2003). Des Weiteren wurde die Expression der NCR (Natural Cytotoxicity Receptors) auf synovialen NK-Zellen untersucht, wobei NKp30 auf peripheren NK-Zellen nachgewiesen werden konnte, auf synovialen NK-Zellen von Arthritis-Patienten jedoch nicht exprimiert war. NKp44 wird auf NK-Zellen nur nach Aktivierung induziert und ist dementsprechend auf peripheren NK-Zellen nicht exprimiert. Bei synovialen NK-Zellen handelt es sich laut de Matos et al jedoch um einen aktivierten Phänotyp, welcher eine erhöhte NKp44-Expression zeigt (de Matos, Berg et al. 2007). Diese Expression konnte in keinem der beiden untersuchten Patientenkollektive nachgewiesen werden. Eine Erklärung könnte die aus technischen Gründen erforderliche Lagerung der Proben über Nacht vor der Aufarbeitung und Analyse sein. Außerdem wurde beschrieben, dass spenderabhängig NKp46<sup>low</sup> und NKp46<sup>bright</sup> NK-Zell-Populationen bestehen (Sivori, Pende et al. 1999) und hoch NKp46-exprimierende NK-Zellen auch eine höhere lytische Aktivität zeigen. Die in meiner Arbeit gezeigte Anreicherung der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit geht in allen Proben mit einer Anreicherung der NKp46-Expression einher (Daten nicht gezeigt).





**Abb. 46** Schematische Darstellung der NK-Zellpopulationen im Blut und der Synovialflüssigkeit

Im Blut befinden sich beide NK-Zell-Subpopulationen: 10% CD56<sup>bright</sup> CD6<sup>-</sup> NK-Zellen (rot) und 90% CD56<sup>dim</sup> CD6<sup>+/-</sup> NK-Zellen (blau). In der Synovialflüssigkeit findet man im Gegensatz dazu eine Dominanz der CD56<sup>bright</sup> CD6<sup>-</sup> NK-Zellen. Wie die Dominanz der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zu Stande kommt, ist noch nicht geklärt. Es ist möglich, dass dabei Chemokine, die in hohem Maße in der Synovialflüssigkeit produziert werden, und Adhäsionsmoleküle an den Endothelien eine selektive Infiltration vermitteln.

Der Phänotyp der synovialen NK-Zellen konnte in dieser Arbeit präzise als CD6<sup>-</sup> CD56<sup>bright</sup> CD94<sup>bright</sup> NKG2A<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> NKp46<sup>bright</sup> beschrieben werden (Abb. 46). Interessanterweise konnte kein phänotypischer Unterschied der synovialen NK-Zellen zwischen den Arthritis- und Arthrose-Patienten festgestellt werden. Die Dominanz der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit scheint also unabhängig vom Ort der Entzündungsreaktion und von der Art der Krankheit zu sein, dagegen aber mit der Gewebeeinfiltration an sich zusammenhängen. Für eine Unabhängigkeit vom Ort der Entzündung spricht, dass auch schon in entzündeter Pleuralflüssigkeit und Peritonealflüssigkeit von Rheuma-Patienten eine Verschiebung der NK-Zell-Subpopulationen beschrieben wurde (Dalbeth, Gundle et al. 2004). Bei Psoriasis-Patienten konnte ebenfalls eine Anreicherung von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Haut beobachtet werden (Ottaviani, Nasorri et al. 2006). Die Dominanz der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen kann auch gänzlich unabhängig von einer Entzündungsreaktion stattfinden, da diese NK-Zell-Subpopulation präferentiell in nicht-reaktiven Lymphknoten zu finden ist (Fehniger, Cooper et al. 2002). Auch in manchen Tumoren, wie z.B. dem Nierenzellkarzinom, konnte teilweise eine erhöhte Frequenz an

CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen detektiert werden (Schleypen, Baur et al. 2006). Die Infiltration könnte also nur von der Expression bestimmter Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen abhängen (Gregoire, Chasson et al. 2007). Der CD6-Ligand ALCAM (*Activated leukocyte adhesion molecule*) stellt ein solches Adhäsionsmolekül dar, dessen Expression auf synovialen Gewebe bei Rheumatoider Arthritis detektiert werden konnte (Levesque, Heinly et al. 1998). In dieser Publikation konnte jedoch keine ALCAM-Expression auf synovialen Gewebe von Gelenkstrauma Patienten und nur eine geringe Expression bei Arthrose-Patienten nachgewiesen werden. Die ALCAM-Expression könnte durch das Zytokinmilieu der Entzündungsreaktion reguliert sein, da die Expression auf Monozyten und DC durch M-CSF, GM-CSF und IL-3 gesteigert werden kann. Neben Monozyten wird ALCAM auf aktivierten T- und B-Zellen, auf Keratinozyten und auf Epithelzellen im Thymus exprimiert (Bowen, Patel et al. 1995, Patel, Wee et al. 1995, Singer, Fox et al. 2002). Eine neuere Veröffentlichung zeigt, dass es ebenfalls auf Endothelzellen des ZNS exprimiert wird und dort eine Rolle bei der Migration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen und Monozyten durch die Endothelien der Blut-Gehirn-Schranke spielt (Cayrol, Wosik et al. 2008). ALCAM hat jedoch in diesem Kontext keinen Effekt auf die Transmigration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die Migration von NK-Zellen wurde nicht untersucht. Es wurde noch ein weiterer CD6-Ligand, als 3A11-Antigen bezeichnet, auf synovialen Fibroblasten und Chondrozyten bei Rheumatoider Arthritis entdeckt (Joo, Singer et al. 2000, Saifullah, Fox et al. 2004), dessen Expression auf synovialen Fibroblasten durch eine Kultivierung mit IFN- $\gamma$  bei Rheumatoiden Arthritis- und Arthrose-Patienten erhöht werden kann. Die Expression der beiden CD6-Liganden auf Synoviozyten könnte zur Interaktion der NK-Zellen (und T-Zellen) mit synovialen Fibroblasten beitragen, wobei periphere CD6<sup>+</sup> NK-Zellen über die CD6-Liganden an synoviale Epithelien binden, und so an ihrer Migration in die Synovialflüssigkeit gehindert werden könnten. Es ist bekannt, dass manche Rezeptoren nach der Bindung ihres Liganden internalisiert werden, um eine effektive Signaltransduktion zu vermitteln. Die CD6-Expression auf der Oberfläche der NK-Zellen könnte aus diesem Grund auch nach der Bindung an die Liganden herunterreguliert werden. Dies würde dazu führen, dass sich keine CD6<sup>+</sup> NK-Zellen mehr in der Synovialflüssigkeit detektieren lassen. Unabhängig davon, welche dieser Möglichkeiten bei der Infiltration in die Synovialflüssigkeit stattfindet, muss jedoch immer ein Unterschied der CD6-Funktion auf T- und NK-Zellen gesehen werden. Die Frequenz der CD6<sup>+</sup> T-Zellen ist mit nahezu 100 % in der Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten unverändert hoch wie in der Peripherie, was CD6 zu einem spezifischen Infiltrationsmarker für NK-Zellen macht. In der Peripherie von Arthritis-

Arthrose- und auch bei Psoriasis-Patienten konnte im Vergleich zu Normalspendern eine verringerte Frequenz der CD56<sup>dim</sup>CD6<sup>+</sup> NK-Zellen nachgewiesen werden. Dies stellt eine Art „Zwischenzustand“ der Populationsverteilung zwischen den Normalspendern und der Synovialflüssigkeit dar. Da hierbei der Unterschied zwischen Normalspendern und Arthritis-Patienten am größten ist, lässt sich vermuten, dass die verminderte CD6<sup>+</sup> NK-Population im Zusammenhang mit der Stärke der Entzündungsreaktion steht. Es wurde beschrieben, dass die Erhöhung der ALCAM-Expression auf Monozyten durch IL-3, M-CSF und GM-CSF vermittelt werden kann (Levesque, Heinly et al. 1998). In den hier untersuchten Patientenkollektiven sind IL-3 und M-CSF nur in den Synovialflüssigkeiten von Arthritis-Patienten erhöht. GM-CSF ist zusätzlich auch im Serum der Arthritis-Patienten erhöht, und könnte dort zu einer Erhöhung der ALCAM-Expression beitragen. Dieser kausale Zusammenhang zwischen der Stärke der Entzündung, der ALCAM-Expression und der selektiven NK-Zellinfiltration ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

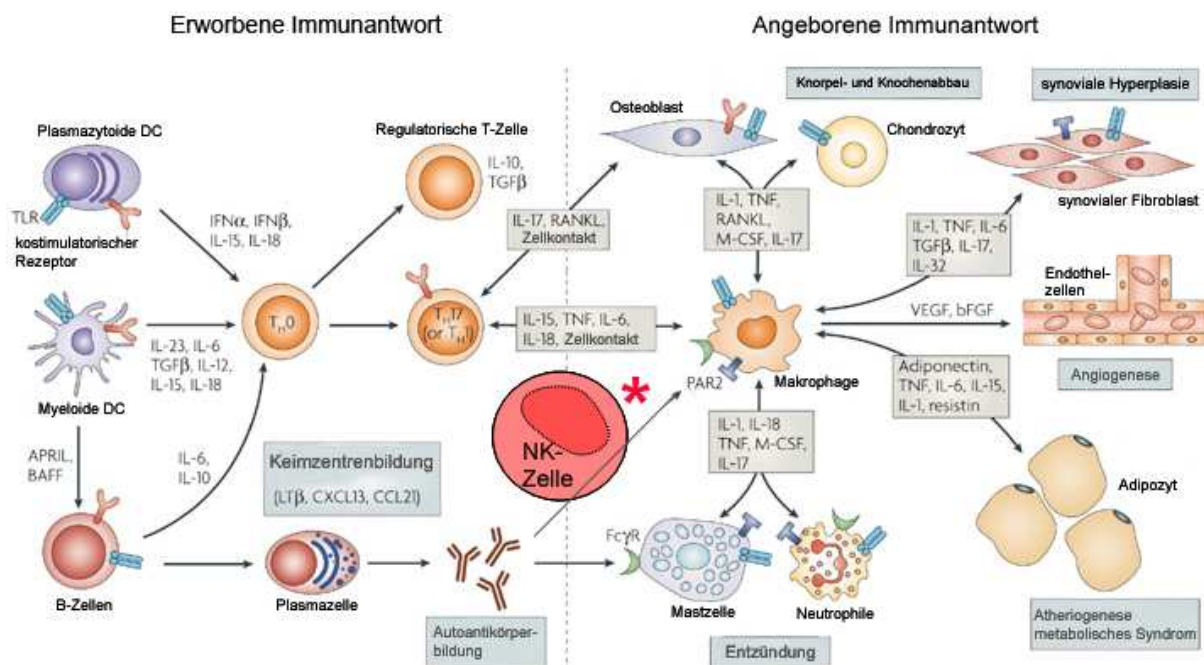
Eine weitere Erklärung für die Dominanz der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit könnte aber auch das unterschiedliche Zytokin/Chemokinmilieu, und die Expression von Chemokinrezeptoren der beiden NK-Zell-Rezeptoren darstellen, welche das Migrationsverhalten der NK-Zell-Subpopulationen maßgeblich mitbestimmen (Campbell, Qin et al. 2001). CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimieren im Vergleich zu CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen CXCR3, CCR7 und CCR5, den Rezeptor für RANTES (CCL5), MIP-1 $\alpha$  (CCL3) und MIP-1 $\beta$  (CCL4). Robinson et al vermuten, dass erhöhte Konzentrationen von MIP-1 $\alpha/\beta$  und RANTES zu einer verstärkten Infiltration von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in die Synovialflüssigkeit führen können (Robinson, Keystone et al. 1995). Dem widerspricht allerdings, dass in den hier untersuchten Patientenproben MIP-1 $\beta$  nur in den Synovialflüssigkeiten der Arthritis-Patienten erhöht ist, und MIP-1 $\alpha$  zusätzlich in den Seren dieser Patienten erhöht ist, jedoch nicht bei Arthrose-Patienten. Interessanterweise ist RANTES in den Synovialflüssigkeiten beider Patientengruppen stark erniedrigt, wobei es unwahrscheinlich ist, dass die RANTES-Produktion in der Synovialflüssigkeit vollständig eingestellt wird. Aus diesem Grund kann man vermuten, dass die CCR5-exprimierenden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen RANTES in den Synovialflüssigkeiten gebunden haben und es so nicht mehr als lösliches Protein zu messen ist. RANTES könnte also tatsächlich zu der vermehrten Präsenz von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit beitragen. Der Chemokinrezeptor CXCR3 zeigt ebenfalls eine hohe Expression auf CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, weshalb die CXCR3-Liganden IP-10 (CXCL10) und MIG (CXCL9) weitere Kandidaten für die NK-Infiltration darstellen, und tatsächlich in den Synovialflüssigkeiten von Arthritis- und Arthrose-Patienten signifikant erhöht sind.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Beobachtungen die Hypothese unterstützen, dass die selektive Infiltration der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in die Synovialflüssigkeit das Resultat aus dem Zusammenspiel zwischen CD6/CD166-vermittelter Adhäsion, und der Chemokin-vermittelten Migration ist.

## 2 Autoimmune und nicht-autoimmune Zytokinmuster

Bei der Integration der NK-Zellen in das Bild der synovialen Immunzellen muss beachtet werden, dass die Zytotoxizität der NK-Zellen selbst in der Synovialflüssigkeit eher eine untergeordnete Rolle spielt. Für die Resorption der Knochenzellen und die Zerstörung des Knorpelgewebes werden die NK-Zellen nicht benötigt, da dies ausschließlich von Osteoklasten und Chondrozyten bewerkstelligt wird. Dementsprechend ist der zweiten Effektorfunktion der NK-Zellen, der Zytokinproduktion, in diesem Kontext eine weit bedeutendere Rolle zuzusprechen. Es war in dieser Arbeit aufgrund des geringen Probenvolumens leider nicht möglich, die NK-Zellen in ausreichender Quantität und Qualität aus der Synovialflüssigkeit zu isolieren und spezifisch deren Zytokinproduktion zu untersuchen, weshalb mittels Multiplex-Analyse die Zytokine, Chemokine und die Wachstumsfaktoren in den Synovialflüssigkeiten und Seren der Patienten untersucht wurden. Aus Publikationen ist bekannt, dass periphere NK-Zellen sich nach dem Kontakt mit synovialen Fibroblasten von CD56<sup>bright</sup> in CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen differenzieren sollen, und dann einen aktivierten Phänotyp (CD69<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>) aufweisen (Chan, Hong et al. 2007). In den Kulturüberständen konnten nach 24 Stunden unter anderem hohe Konzentrationen an IL-6, IL-8, GM-CSF und MCP-1 gemessen werden, wobei diese Zytokine auch von Fibroblasten alleine produziert werden. Dieses Muster entspricht der Zytokin/ Chemokinproduktion verschiedener NK-Linien, sowie alloreaktiven NK-Linien und NK-Klonen (Dissertation M. Braun). Aus unseren Untersuchungen geht hervor, dass NK-Zellen nach Stimulation bestimmter Rezeptoren wie NKG2D, NCR oder 2B4 erst nach mindestens 48 Stunden eine hohe Zytokinproduktion zeigen. So sind die NK-Zelllinien NKL, NK92 und YT dazu in der Lage IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , RANTES, SDF-1 $\alpha$ , HGF, M-CSF, MIF, GM-CSF und VEGF zu produzieren, wobei manche Zytokine/ Chemokine konstitutiv sezerniert werden, und andere erst nach Stimulation mit PMA/Ionomycin induziert werden.

Eine Reihe an Zytokinen ist in jede Phase der Pathogenese von Rheumatoider Arthritis verwickelt, wobei sie die Autoimmunität vermitteln, die chronische Entzündungsreaktion der Gelenkinnenhaut (Synovia) aufrechterhalten, und die Zerstörung des angrenzenden Gewebes verursachen (McInnes and Schett 2007). Die Zytokine verbinden so die immunregulatorischen Prozesse mit den zur Gewebezzerstörung führenden Prozessen und tragen so wesentlich zum klinischen Erscheinungsbild und zum Verlauf der Krankheit bei. Bis jetzt liegen zum größten Teil nur Einzeldaten über die verschiedenen Zytokine, z.B. IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$ , vor, die in Übersichtsartikeln zu einem Bild zusammengefasst werden (Abb. 47) (McInnes and Schett 2007). Auch liegen bisher nur wenige Daten über die Zytokinproduktion synovialer NK-Zellen vor, so dass diese noch nicht in die bisher beschriebenen Netzwerke integriert werden konnten.



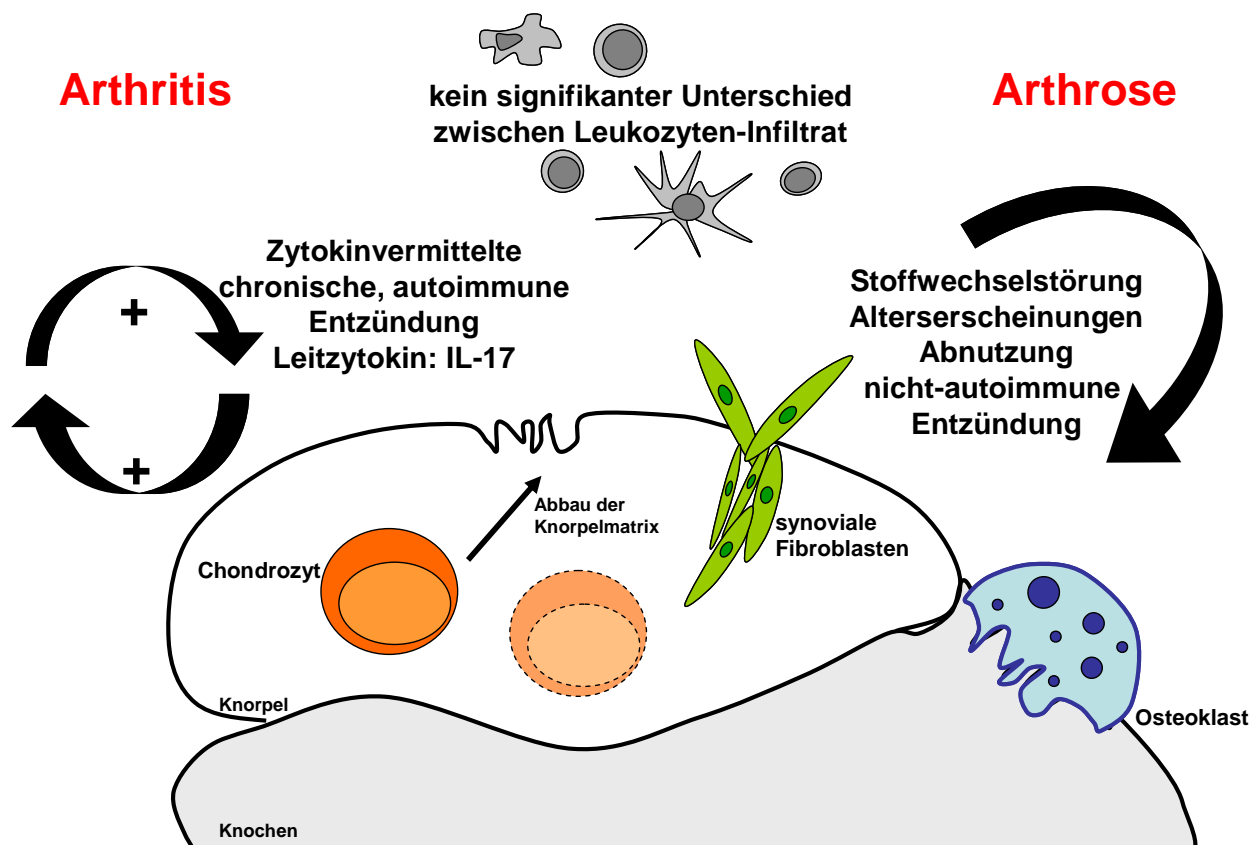
**Abb. 47 Übersicht der zytokinvermittelten synovialen Interaktionen bei Rheumatoider Arthritis**

Gezeigt sind die, in der Synovialflüssigkeit enthaltenen Zellen des erworbenen und angeborenen Immunsystems und ihre, über Zytokine vermittelten Interaktionen. \* Anmerkung: Die NK-Zellen wurden in dieses Zytokinnetzwerk zusätzlich integriert. Adaptiert nach McInnes et al (McInnes and Schett 2007).

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine so umfassende Analyse der Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren in der Synovialflüssigkeit und ein direkter Vergleich mit den autologen Seren durchgeführt. Die Schwierigkeit bestand darin, neben den individuellen Signifikanzen alle 50 Parameter in das Netzwerk der synovialen Zellen und deren zytokinvermittelte Interaktionen einzuordnen. Zudem sollte der Unterschied zwischen einem autoimmunem und einem nicht-autoimmunem Zytokin-/Chemokinmustern beschrieben werden.

Das zelluläre Infiltrat in den Gelenken von Arthritis- und Arthrose-Patienten besteht aus synovialen Fibroblasten, Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen. All diese Zellen können Zytokine produzieren und sind an der synovialen Entzündung beteiligt. In den letzten Jahren wurden einige Zytokine identifiziert, welche für das Entstehen und die Aufrechterhaltung der lokalen Entzündung unerlässlich sind. So wurde die Rheumatoide Arthritis zunächst als T<sub>H</sub>1-vermittelte Krankheit angesehen und IFN- $\gamma$  als Effektorzytokin untersucht. Die Konzentration von IFN- $\gamma$  in der Synovialflüssigkeit und im Serum von Arthritis-Patienten ist zwar tatsächlich stark erhöht, neuere Daten postulieren jedoch IL-17 als das entscheidende Leitzytokin der proinflammatorischen Immunantwort bei Arthritis (Singh, Aggarwal et al. 2007), das, soweit heute bekannt, von T<sub>H</sub>17-Zellen produziert wird (Lubberts, Koenders et al. 2005). Die IL-17 Konzentration ist zwar im Vergleich zu vielen anderen Analyten in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten eher gering, es fällt aber auf, dass in der Synovialflüssigkeit von Arthrose-Patienten überhaupt kein IL-17 vorhanden ist. Dies stellt den bedeutendsten Unterschied zwischen Arthritis- und Arthrose-Patienten dar. Der Ursprung des synovialen IL-17 in den hier untersuchten Patientenkollektiven konnte nicht geklärt werden, da keine NK- oder T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit isoliert werden konnten. IL-17 selbst bewirkt die Differenzierung, Reifung, Aktivierung und Zytokinproduktion von neutrophilen Granulozyten und führt zur Aktivierung und Zytokin-/Chemokinproduktion von synovialen Monozyten und Fibroblasten und zur Osteoklastogenese (Weaver, Hatton et al. 2007). IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-23 sind für die Differenzierung, das Überleben, und die Expansion von T<sub>H</sub>17-Zellen essentiell. IL-6 ist zwar auch bei Arthrose-Patienten in der Synovialflüssigkeit vorhanden, bei Arthritis-Patienten zeigt es jedoch eine wesentlich stärkere Erhöhung, IL-1 $\beta$  dagegen fehlt in der Synovialflüssigkeit von Arthrose-Patienten sogar vollständig. IL-12 und IL-23 besitzen eine gemeinsame p40-Untereinheit. Vergleicht man die Konzentrationen von IL-12p40 und IL-12p70, welches das „echte“ IL-12 darstellt, sieht man, dass IL-12p40 bei Arthritis-Patienten wesentlich stärker erhöht ist als IL-12p70. Dies spricht indirekt für eine erhöhte Konzentration von IL-23, ein Zytokin was wiederum die T<sub>H</sub>17-Immunantwort unterstützt. IL-15 besitzt eine wichtige Rolle in der Induktion des Wachstums von synovialen T-Zellen, wirkt sich aber selbst nicht direkt auf deren Zytokinproduktion aus. Es ist also nicht verwunderlich, dass IL-15 auch in der Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten signifikant erhöht ist. Für die Integration der NK-Zellen in die IL-17-vermittelte Immunantwort liegen bisher kaum Daten vor. Chan et al konnten, nach Stimulation mit synovialen Fibroblasten, keine IL-17 Produktion von NK-Zellen zeigen (Chan, Filer et al. 2008), wobei die

Zytokinproduktion jedoch schon nach 24 Stunden Kokultivierung gemessen wurde. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass NK-Zellen nach einer spezifischen Rezeptorstimulation zum Teil erst nach 96 Stunden dazu in der Lage sind, IL-17 zu produzieren (Daten nicht gezeigt, Dissertation M. Braun). Es wäre also durchaus möglich, die NK-Zellen in das Bild der  $T_H17$ -Immunantwort zu integrieren. Dies ist ein Fokus der weiterführenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe. IL-17 führt zusammen mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  zur Aktivierung und Zytokinproduktion der synovialen Fibroblasten (Miossec 2003), welche durch die Freisetzung von IL-1, IL-6, GM-CSF und den Chemokinen CCL2 und CCL5 wiederum die Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen unterstützen, was den Effekt einer positiven Rückkopplung hat und die Immunreaktion aufrecht erhält (siehe Abb. 48).



**Abb. 48 Schematische Darstellung der Hypothesen für die Entstehung der autoimmunen und nicht-autoimmunen Gelenkentzündung**

Bei Arthritis- und Arthrose-Patienten liegt das gleiche Leukozyten-Infiltrat in der Synovialflüssigkeit vor. Das Resultat der beiden Krankheiten, die Schädigung des Knorpels und des Knochens, ist ebenfalls gleich. Bei Arthritis-Patienten findet im Gegensatz zu den Arthrose-Patienten eine IL-17-vermittelte Immunreaktion statt, welche autoimmunen Ursprung besitzt und sich durch positive Rückkopplungseffekte selbst aufrecht erhält. Durch diese Prozesse kann es zu einer starken, chronischen Entzündung und zur Aktivierung von Chondrozyten und Osteoklasten kommen. Bei Arthrose gibt es keinen autoimmunen Ursprung, sondern Stoffwechselstörungen und altersbedingte Knorpel- und Knochenabnutzung führen zu einer „physiologischen“ Entzündung der Gelenke, an der kein IL-17 beteiligt ist.

Die Blockierung von TNF $\alpha$  durch Antikörper bzw. lösliche Rezeptoren zeigt bei der Behandlung von Arthritis-Patienten teilweise eine hohe Effizienz, was für eine zentrale Rolle von TNF $\alpha$  in diesem autoimmunen Kontext spricht. IL-17 kann die IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -Produktion in T-Zellen selbst induzieren und ist über die Induktion des Osteoklastendifferenzierungsfaktors RANKL auch direkt an der Osteoklastogenese und der nachfolgenden Zerstörung der Gelenke beteiligt. Die Entzündungsreaktionen und die Zerstörung des Knochens sind also bei autoimmunen Arthritis-Patienten eng miteinander verbunden (Goldring 2003). Normalerweise steht die Knochenneubildung in einem Gleichgewicht mit der Resorption von Knochen, welche durch Osteoklasten vermittelt wird (Teitelbaum 2000). Bei Rheumatoider Arthritis müssen Osteoklasten-Vorläuferzellen zunächst in das synoviale Gewebe infiltrieren und dort reifen. Die Aktivierung ihrer metabolischen Aktivitäten zum Knochenabbau wird dann durch Zytokine wie TNF $\alpha$  oder RANKL vermittelt, welche von Lymphozyten und synovialen Fibroblasten gebildet werden. Für die Differenzierung der Osteoklasten-Vorläufer sind M-CSF, TNF $\alpha$  und RANKL essentiell. RANKL war in der Multiplex Analyse leider nicht enthalten und wird gesondert untersucht werden. Es konnte jedoch eine signifikante Erhöhung von M-CSF in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-, aber nicht von Arthrose-Patienten gezeigt werden (Abb. 57 und Tab. 15, Anhang S.154,156), was einen Hinweis auf die Osteoklastogenese liefert. Osteoklasten resorbieren nicht nur Knochen, sondern bauen auch die an den Knochen angrenzende, mineralisierte Schicht des Knorpels ab. In der nicht mineralisierten Schicht des Knorpels befinden sich Chondrozyten, welche den Stoffwechsel des Knorpels aufrecht erhalten. Die Chondrozyten können von einem anabolischen, Knorpelmatrix-synthetisierenden Zustand in einen katabolischen Zustand wechseln. Sie produzieren dann Metalloproteasen wie ADAM10 und ADAM17, welche Proteoglykan und Kollagenfasern spalten (McInnes and Schett 2007), und Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-17, TNF $\alpha$  und IL-18, welche wiederum die pro-inflammatorische Immunantwort aufrecht erhalten. Durch das Absterben von Chondrozyten entstehen regionale „Lücken“, die zu einer porösen Knorpelsubstanz führen.

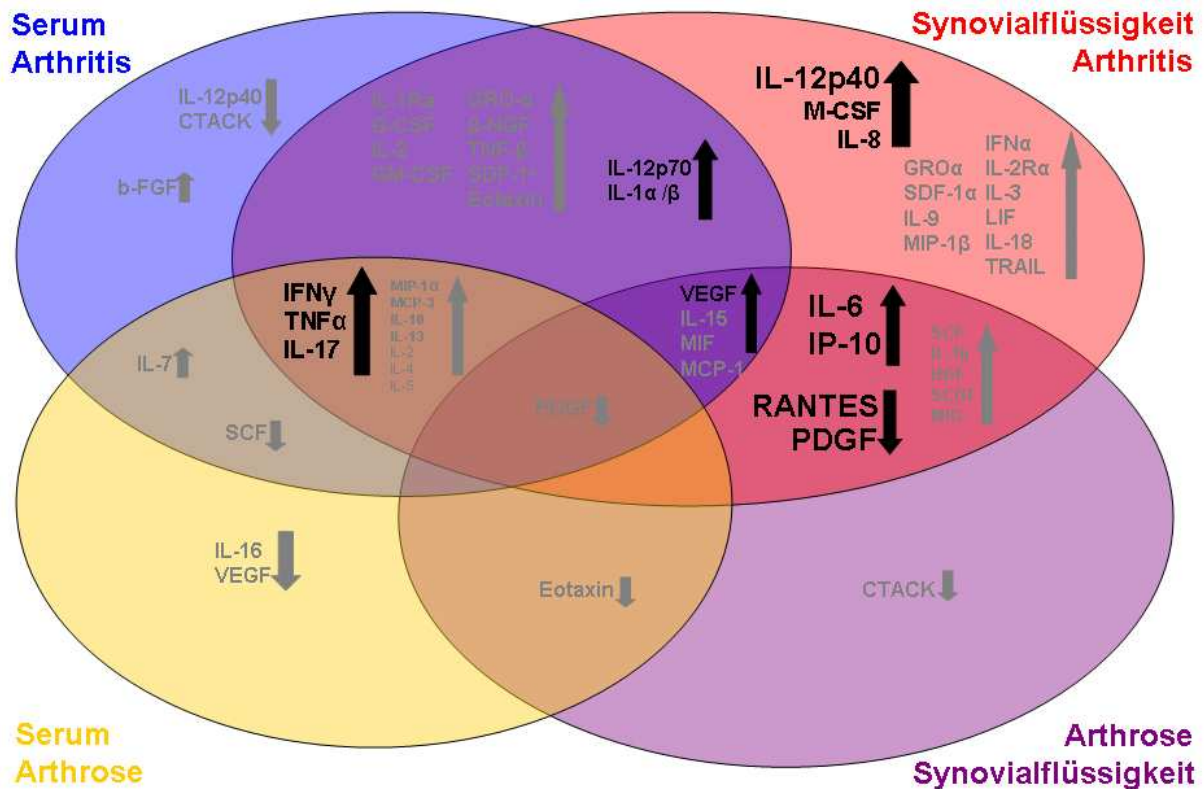
In der Literatur wird kontrovers diskutiert, dass Fibroblasten in Gelenken von Arthritis-Patienten ihre Kontaktinhibition verlieren und verstärkt proliferieren, was zu der Hyperplasie der synovialen Membran führen könnte (Seemayer, Kuchen et al. 2003, Meyer, Franssen et al. 2006). Aktivierte synoviale Fibroblasten produzieren bei Arthritis-Patienten selbst matrixabbauende Enzyme, invadieren das benachbarte Knorpelgewebe und aktivieren dort Chondrozyten und Osteoklasten. Bei der Entstehung der hyperplastischen synovialen



Membran sind b-FGF und PDGF unerlässlich. b-FGF ist im Vergleich zum Serum in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten signifikant erniedrigt und bei Arthrose-Patienten fehlt es in der Synovialflüssigkeit fast vollständig. PDGF ist ebenfalls in beiden Synovialflüssigkeiten signifikant erniedrigt. Es ist möglich, dass diese Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren gebunden sind und so in der Multiplexanalyse nicht detektierbar sind. Alternativ könnte ein Verbrauch dieser Faktoren zu einer Art „Unterversorgung“ des Knorpel- und Knochengewebe führen. Ein weiterer Wachstumsfaktor, VEGF, der eine entscheidende Rolle bei der Blutgefäßbildung spielt, ist in den Synovialflüssigkeiten der Arthritis- und Arthrose-Patienten hoch signifikant erhöht. Bei Rheumatoider Arthritis findet typischerweise eine ungeordnete Angiogenese im Synovium statt, die für die Entzündungsreaktionen und die Gewebeerstörung benötigt wird.

Neben der  $T_H17$ -vermittelten Immunreaktion und ihren Effekten auf die Zerstörung des Gewebes, wurden bei Arthritis- und Arthrose-Patienten auch  $T_H1$ -Zytokine, wie IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF $\beta$  in erhöhten Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit gefunden.  $T_H2$ -Zytokine, wie IL-4, IL-5, IL-13 und IL-10 liegen zwar nur in geringen Konzentrationen vor, sind jedoch im Vergleich zu Normalspendern auch signifikant erhöht. Die Konzentrationen der signifikant erhöhten anti-inflammatorischen Zytokine, wie z.B. IL-10, sind aber offensichtlich nicht hoch genug, um das dominante pro-inflammatorische Zytokinmilieu „umzupolen“.  $T_H1$ -Zellen inhibieren eigentlich durch ihre eigene Zytokinproduktion  $T_H2$ -Zellen und umgekehrt. Diese Beobachtung konnte auch schon zwischen  $T_H1$ ,  $T_H2$  und  $T_H17$ - Zellen gemacht werden (Harrington, Hatton et al. 2005, Park, Li et al. 2005, Nakae, Iwakura et al. 2007). Da in der Synovialflüssigkeit aber auch  $T_H1$  und  $T_H2$  Zytokine vorhanden sind, und nicht alle infiltrierenden T-Zellen  $T_H17$ -Zellen darstellen, lässt sich interpretieren, dass in der Synovialflüssigkeit ein Mosaikmuster aus  $T_H1$ -,  $T_H17$ - und wenigen  $T_H2$ -Zellen vorliegt, das jedoch von der  $T_H1/T_H17$ -Antwort dominiert wird. Die Infiltration der verschiedenen T-Zell-Populationen könnte auch in einer chronologischen Reihenfolge stattfinden. Eine Studie an einem Rattenmodell zeigte, dass bei Arthritis, welche durch die Injektion mit komplettem Freudschen Adjuvans ausgelöst wurde, eine Verbesserung oder Verschlechterung des Krankheitsbildes davon abhängt, wann das  $T_H1$ -Zytokin IFN- $\gamma$  gegeben wird (Jacob, Holoshitz et al. 1989). IFN $\gamma$  kann die Osteoklastendifferenzierung hemmen, und könnte also, je nach Zeitpunkt der Verabreichung, von Vorteil oder von Nachteil für Patienten mit Rheumatoider Arthritis sein.

Das Lymphozyteninfiltrat im Synovium kann mehrere Strukturen bilden: die Zellen können diffus verteilt vorliegen, in lockeren Aggregaten oder geordnete Strukturen bilden, welche sogar Keimzentren („*germinal centers*“) beinhalten können (Weyand and Goronzy 2003, Wengner, Hopken et al. 2007). An der Organisation tertiärer Lymphorgane sind vor allem Chemokine beteiligt. So vermitteln z.B. CXCL13 und CCL21 die Bildung der synovialen Keimzentren (Takemura, Braun et al. 2001) und CXCR5 und CCR7 sind essentiell im Mausmodell (Wengner, Hopken et al. 2007). Chemokine sind bei synovialen Entzündungsprozessen auch an der Rekrutierung, Diapedese und Aktivierung von Leukozyten beteiligt. Wie schon beschrieben, kann die hohe Expression von IP-10 (CXCL10) für die vermehrte Rekrutierung der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen verantwortlich sein, da diese dessen Rezeptor CXCR3 exprimieren. Es wurden schon mehrere Chemokine als therapeutische Ziele evaluiert (Haringman and Tak 2004, Koch 2005), wobei diese Studien bis jetzt jedoch noch keine großen Erfolge zeigten. Im Gegensatz zu den Chemokinen sind schon viele Zytokine als therapeutisches Target untersucht worden. Die Blockade von TNF $\alpha$  ist zwar erfolgreich, schlägt aber bei manchen Patienten nicht an. Nach den neuesten Untersuchungen über die T<sub>H</sub>17-Immunantwort bei Arthritis-Patienten, werden auch IL-6, IL-15, IL-12, IL-23, IL-18 und IL-17 als therapeutische Ziele vorgeschlagen. Es ist jedoch nicht einfach, das richtige therapeutische Zielzytokin bzw. den geeigneten Inhibitor herauszufinden, da das hierarchische Zusammenspiel der Zytokine und die Kreuzvernetzungen noch unklar sind. Um diese Zusammenhänge zu untersuchen, müssen komplexe Zytokinmuster identifiziert und neben TNF $\alpha$  und IL-17 noch weitere Leitzytokine identifiziert werden. In dieser Arbeit wurden deshalb die signifikanten und biologisch relevanten Unterschiede, der in der Multiplex-Analyse identifizierten Zytokine/ Chemokine/ Wachstumsfaktoren, zwischen dem Serum und der Synovialflüssigkeit der Arthritis-Patienten herausgearbeitet, und mit den Arthrose-Patienten verglichen. Hierbei ergab sich folgendes Schaubild (Abb. 49), in welchem die Leitzytokine hervorgehoben sind:



**Abb. 49** Leitzytokine im Serum und in der Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten

Die in der Multiplex-Analyse untersuchten Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren wurden anhand der signifikanten Unterschiede und anhand der biologischen Relevanz der Veränderungen der Zytokinkonzentrationen in Gruppen eingeteilt. Die grau markierten Analyte liegen entweder nur in geringen Konzentrationen vor oder sie spielen eine weniger wichtige Rolle. Schwarz hervorgehoben sind die Leitzytokine der jeweiligen Gruppen.

Eine gute Möglichkeit, die in dieser Arbeit erstellten gesamten Zytokin- und Chemokinmuster der Arthritis- und Arthrose-Patienten zu analysieren bestand darin, die Ratio zwischen der Zytokinkonzentration in der Synovialflüssigkeit und der Konzentration im autologen Serum zu bilden. Man erhielt so die x-fache Erhöhung, bzw. Erniedrigung der Zytokinkonzentration in der Synovialflüssigkeit, welche dann je nach ihrer Stärke farblich markiert wurde. Durch diese Auswertemethode konnte gezeigt werden, dass sich das Zytokinmuster bei den autoimmunen Arthritis-Patienten sehr deutlich von den nicht-autoimmunen Arthrose-Patienten unterscheidet. Bei Arthrose-Patienten sind in der Synovialflüssigkeit wesentlich weniger Zytokine und Chemokine erhöht. Viele zeigen sogar eine Erniedrigung im Vergleich zum autologen Serum, was für ein anti-inflammatorisches Muster spricht. Unter dem Patientenkollektiv der Rheuma-Ambulanz aus München befanden sich einige „Ausnahmen“, welche von nicht-autoimmunen Patienten stammten, aber klinisch auffällig waren und punktiert wurden. Für die phänotypische Untersuchung der Infiltration mussten diese nicht getrennt von den anderen betrachtet werden, da die Zusammensetzung des NK-Zell-Repertoires unabhängig vom Krankheitsbild ist. Bei der Untersuchung der Zytokine wurden

jedoch große Unterschiede dieser „Ausnahmen“ sichtbar. Am deutlichsten hob sich der Patient mit Lyme Borreliose (SYN#10) von den autoimmunen Arthritis-Patienten ab. Lyme-Arthritis wird durch eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* Bakterien ausgelöst. Offensichtlich läuft diese post-infektiöse Reaktion immunologisch trotz bakterieller Infektion anders ab, als die autoimmune Arthritis-Entzündung. Des Weiteren unterschieden sich ein Patient mit einer undifferenzierten Oligoarthritis (SYN#17) und einer aktivierten Arthrose (SYN#19) von dem autoimmunen Arthritis-Patientenkollektiv. Diese drei Patienten entsprachen bezüglich des Zytokinmusters deutlich den Arthrose-Patienten. Diese signifikanten Unterschiede im Zytokinmuster könnten zukünftig als prognostischer Marker verwendet werden, um eine Autoimmunkrankheit von einer nicht-autoimmunen Erkrankung zu unterscheiden. Um die Belastbarkeit dieser Muster als prognostischen oder diagnostischen Marker zu testen, wurden die Daten mit der Genepilot-Software analysiert, um zu prüfen, ob durch eine unbeeinflusste Cluster-Analyse die selben Ergebnisse erzielt werden können. Die Software erhielt vor der Berechnung keine Informationen über den klinischen Hintergrund der Patienten („unsupervised Cluster Analysis“) und erstellte Gruppen nur anhand der Konzentrationen der Zytokine/Chemokine und Wachstumsfaktoren. Durch diese Analyse gelang ebenfalls die Unterscheidung der autoimmunen und nicht-autoimmunen Synovialflüssigkeitsproben, wobei genannten Ausnahmen folgerichtig in die Arthrose-Gruppe eingeordnet wurden. In dieser Analyse war SYN#10 nicht enthalten, SYN#19, SYN#17 und SYN#23 fanden sich jedoch in der Gruppe der nicht-autoimmunen Synovialflüssigkeiten wieder. Die Seren der autoimmunen und nicht-autoimmunen Patienten fielen zwar in eine Gruppe, unterschieden sich aber doch deutlich von Normalspender-Seren. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass das Muster der Zytokin-/Chemokinkonzentrationen in den Seren und Synovialflüssigkeiten dazu verwendet werden kann, die Krankheiten in einen autoimmunen bzw. nicht-autoimmunen Kontext einzuordnen.

Die Gesamtheit der Daten dieser Arbeit zeigt, dass die autoimmunen Gelenkentzündungen mit den nicht-autoimmunen Gelenkentzündungen einige Charakteristika teilen, und sich in anderen signifikant unterscheiden. In dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass sich das synoviale NK-Zell-Infiltrat der beiden Erkrankungen nicht signifikant unterscheidet, wobei sich auch andere infiltrierende Lymphozyten- und Makrophagen-Populationen nicht voneinander unterscheiden (eigene Beobachtungen). Die Infiltration der Immunzellen in die Synovialflüssigkeit korreliert bei beiden Krankheiten mit der Erhöhung der Chemokinkonzentrationen (v.a. IP-10, MIG und MCP-1) und einigen Wachstumsfaktoren

(v.a. SCF, SCGF, HGF und VEGF). Bei beiden Krankheiten kommt es aber letztendlich zur Zerstörung des Knorpel- und Knochengewebes, woraus sich durch die Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit folgende Hypothese formulieren lässt (Abb. 48): Da bei Arthritis-Patienten im Gegensatz zu den Arthrose-Patienten eine  $T_H17$ -vermittelte Autoimmunreaktion stattfindet, bei beiden Patientengruppen aber als Resultat eine Schädigung der Gelenke stattfindet, müssen offensichtlich zwei verschiedene Wege existieren, welche zum gleichen pathologischen Ergebnis führen. Bei den Arthritis-Patienten besitzt die Krankheit einen autoimmunen Ursprung, wobei über das Leitzytokin IL-17 eine chronische (pathologische) Entzündungsreaktion entsteht, die in Schüben verläuft und sich durch positive Rückkopplungseffekte ständig selbst aufrecht erhält. Dieses dominante pro-inflammatorische Milieu in den Gelenken, führt zu einer Aktivierung von Osteoklasten und Chondrozyten, was dann letztendlich zur Zerstörung des Knorpel- und Knochengewebes führt. Bei der Arthrose hingegen, stellt nicht das Immunsystem den Ursprung der Erkrankung dar. Bei dieser Krankheit führen andere Ursachen, z.B. Stoffwechselstörungen und altersbedingte Knorpel- und Knochenabnutzung zu einer „physiologischen“ Entzündung der Gelenke, an der keine  $T_H17$ -Antwort beteiligt ist. Abb. 48 zeigt die Hypothese der unterschiedlichen Entstehungswege der beiden Krankheiten, welche dieselben pathologischen Auswirkungen auf die Gelenke haben.

Aus diesen unterschiedlichen Wegen zum gleichen pathologischen Endpunkt, der Knorpel- und Knochendegeneration, ergeben sich möglicherweise neue und vor allem unterschiedliche Ansätze für therapeutische Interventionen. Bei der Arthritis sollten diese schwerpunktmäßig auf der Blockierung der autoimmunen Rückkopplung liegen, bei der Arthrose dagegen auf der Verlangsamung des nicht-autoimmunen Prozesses der Degeneration durch Fehlbelastung, Abnutzung und „Alterungsprozessen“.

### 3 Frequenz der NK-Zellen bei Autoimmunkrankheiten

Um die synovialen NK-Zellen mit den peripheren NK-Zellen vergleichen zu können, wurden SFMC aus der Synovialflüssigkeit und PBMC aus dem Blut von Patienten und Normalspendern isoliert und durchflusszytometrisch charakterisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Frequenz der peripheren NK-Zellen von Arthritis-Patienten im Vergleich zur Normalspenderanzahl keinen signifikanten Unterschied aufweist. Die NK-Zell-Frequenz in der Peripherie von Arthrose-Patienten ist jedoch interessanterweise signifikant verringert. Dies widerspricht früheren Beobachtungen, welche bei verschiedenen autoimmunen Erkrankungen eine Assoziation mit einer verringerten Frequenz an peripheren NK-Zellen zeigten (Hoffman 1980, Herold, Huen et al. 1984, Negishi, Waldeck et al. 1986, Lorini, Moretta et al. 1994, French and Yokoyama 2004). Die meisten älteren Untersuchungen unterscheiden weder zwischen CD56<sup>bright/dim</sup> NK- noch NKT-Zellen, wobei NKT-Zellen präzise definiert eine Subpopulation von T-Zellen darstellen, die auch dazu in der Lage ist große Mengen an Zytokinen zu produzieren. Ein peripherer Verlust von NK-Zellen konnte auch schon bei Patienten mit juveniler Rheumatoider Arthritis und Rheumatoider Arthritis gezeigt werden (Grom, Villanueva et al. 2003). Im Vergleich zur Peripherie nimmt die Frequenz der NK-Zellen in den Synovialflüssigkeiten der hier untersuchten Patienten nicht ab, was Ergebnisse der Untersuchung von Arthritis-Patienten bestätigt (de Matos, Berg et al. 2007). Auch bei den hier untersuchten Psoriasis-Patienten konnte keine signifikante Verringerung der peripheren NK-Zell-Frequenz gezeigt werden, was anderen Untersuchungen widerspricht (Cameron, Kirby et al. 2003). Es ist noch nicht geklärt, ob die Veränderungen im NK-Zell-Repertoire einen primären Effekt bei einer Autoimmunerkrankung darstellen, welcher an der Entwicklung des Krankheitsbilds beteiligt ist, oder ob die verringerte NK-Zellanzahl ein sekundäres Ereignis ist, welches sich erst im Zuge der Krankheit entwickelt, weil NK-Zellen zum Beispiel in das Gewebe einwandern (French and Yokoyama 2004). Die NK-Zell-Degeneration stellt jedoch keinen generellen Nebeneffekt der Behandlung oder einer langen chronischen Krankheit dar, da sie auch schon zum Zeitpunkt der Diagnose und vor einer medikamentösen Behandlung festgestellt werden konnte (Yabuhara, Yang et al. 1996). Weitere Untersuchungen bezüglich der verschiedenen NK-Subpopulationen im Gewebe und der Peripherie sind notwendig, um die Bedeutung dieser Veränderungen für den Verlauf einer Autoimmunkrankheit besser beschreiben zu können.

## 4 KIR- und HLA-C-Assoziationen bei Rheumatoider Arthritis und Psoriasis vulgaris

Da bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten, unter anderem auch bei Psoriasis vulgaris und Rheumatoider Arthritis, bereits genetische Assoziationen mit den KIR- und HLA-C-Genloci beschrieben worden sind, habe ich die Patientenkollektive auch dahingehend untersucht. Bei den Psoriasis vulgaris-Patienten konnte durch die HLA-C-Typisierung die in der Literatur seit langem beschriebene Assoziation mit HLA-Cw\*06 bestätigt werden (Tiilikainen, Lassus et al. 1980, Mallon, Bunce et al. 1997), da 44 % der Patienten dieses HLA-C-Allel besitzen. In dem in dieser Arbeit typisierten Normalspenderkollektiv besitzen 30 % der Spender dieses Gen, wobei die Beurteilung aufgrund der niedrigen Spenderzahl (n=13) immer kritisch betrachtet werden muss. In einer großen Kontrollstudie (Becker, Tonn et al. 2003) (Rohdaten selbst ausgewertet) ergab sich eine HLA-Cw\*06-Frequenz von 14 %, was zeigt, dass bei den Psoriasis-Patienten eine deutliche Assoziation mit diesem Allel vorhanden ist. HLA-Cw\*06 gehört zur C2-Gruppe. Weshalb die Verteilung der C1/C2 heterozygoten bzw. C1/C1 und C2/C2 homozygoten Gruppen untersucht wurde. Diese Einteilung der Psoriasis-Patienten in die HLA-C-Haplotypen der C1- und C2-Gruppe ergab jedoch keine Unterschiede zu dem untersuchten Normalspenderkollektiv. Parallel zu HLA-C müssen immer die KIR-Haplotypen A und B analysiert werden, da in diesen der Hauptunterschied der Haplotypen, die Anzahl der vorhandenen aktivierenden KIR, liegt und durch die Einteilung bestimmt werden kann. 32 % der Psoriasis-Patienten besitzen homozygot den AΔ/AΔ-Haplotyp, wobei auf beiden Chromosomen die Deletionsmutante des einzigen, in Haplotyp A vorhandenen, aktivierenden KIR (KIR2DS4) vorliegt, wodurch kein aktivierender KIR vorhanden ist. 12 % der Patienten sind A/A oder AΔ/A und besitzen neben den inhibierenden KIR nur KIR2DS4 als einzigen aktivierenden Rezeptor. 41 % der Patienten exprimieren mehr als einen KIR, im Falle von A/B Kombination und 15 % der Patienten exprimieren sogar mehr als drei aktivierenden KIR, da sie den homozygoten Haplotyp B besitzen (B/B). Vergleicht man diese Frequenzen mit der Kontrollstudie von Becker et al., die eine AΔ/AΔ-Frequenz von nur 2 % beschreiben (Becker, Tonn et al. 2003) (Rohdaten selbst ausgewertet), so fällt die wesentlich höhere Frequenz dieser Kombination im Psoriasis-Patientenkollektiv auf. Im autoimmunen Kontext sind vorwiegend Assoziationen mit aktivierenden KIR beschrieben, meist in Kombination mit der Abwesenheit der Liganden für die entsprechenden Rezeptoren (Martin, Nelson et al. 2002, Williams, Meenagh et al. 2005). Diese Konstellation würde zu einer Aktivierung der NK-Zellen oder zu einer Kostimulation der KIR-positiven T-Zellen führen, da die inhibierenden

Signale fehlen (Vgl. Abb. 9, Einleitung S.19). Die geringe Anzahl an aktivierenden Rezeptoren in diesem Patientenkollektiv widerspricht jedoch dieser Hypothese zunächst, zumal durch die kombinierte Analyse der KIR- und HLA-C-Haplotypen gezeigt werden konnte, dass nur 9 Psoriasis-Patienten (22 %) potentiell diese „aktivierende“ Kombination aufweisen, was den Normalspendern entspricht (23 %, n=13). In einer größeren Studie wurden 39 % der Spender diese Kombination zugeordnet (Becker, Tonn et al. 2003). Bei unseren Rheumatoiden Arthritis-Patienten besitzen 36 % diese HLA-C-KIR-Kombination, was, im Vergleich zu den Normalspendern ebenfalls keiner Erhöhung entspricht. Auffallend ist jedoch, dass auch 27 % der Rheumatoiden Arthritis-Patienten den Haplotyp AΔ/AΔ besitzen, und somit keinen aktivierenden KIR exprimieren. Dies entspricht, wie bei den Psoriasis-Patienten, einer erhöhten Frequenz im Vergleich zu den Normalspendern.



## G Literaturverzeichnis

**Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., et al.** (2007). Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8 (9):942-9

**Adam, C., King, S., et al.** (2005). DC-NK cell cross talk as a novel CD4 $^{+}$  T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 106 (1):338-44

**Alcami, A. and Koszinowski, U. H.** (2000). Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today* 21 (9):447-55

**Andre, P., Spertini, O., et al.** (2000). Modification of P-selectin glycoprotein ligand-1 with a natural killer cell-restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (7):3400-5

**Anfossi, N., Andre, P., et al.** (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25 (2):331-42

**Arnon, T. I., Lev, M., et al.** (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 31 (9):2680-9

**Aruffo, A., Bowen, M. A., et al.** (1997). CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function? *Immunol Today* 18 (10):498-504

**Bauer, S., Groh, V., et al.** (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285 (5428):727-9

**Becker, S., Tonn, T., et al.** (2003). Assessment of killer cell immunoglobulinlike receptor expression and corresponding HLA class I phenotypes demonstrates heterogeneous KIR expression independent of anticipated HLA class I ligands. *Hum. Immunol.* 64 (2):183-193

**Betts, M. R., Brenchley, J. M., et al.** (2003). Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8 $^{+}$  T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281 (1-2):65-78

**Biassoni, R., Falco, M., et al.** (1995). Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones. *J. Exp. Med.* 182 (2):605-609

**Billadeau, D. D., Upshaw, J. L., et al.** (2003). NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat. Immunol.* 4 (6):557-564

**Blanca, I. R., Bere, E. W., et al.** (2001). Human B cell activation by autologous NK cells is regulated by CD40-CD40 ligand interaction: role of memory B cells and CD5 $^{+}$  B cells. *J Immunol* 167 (11):6132-9

**Blery, M., Olcese, L., et al.** (2000). Early signaling via inhibitory and activating NK receptors. *Hum. Immunol.* 61 (1):51-64

**Bott, C. M., Doshi, J. B., et al.** (1993). Activation of human T cells through CD6: functional effects of a novel anti-CD6 monoclonal antibody and definition of four epitopes of the CD6 glycoprotein. *Int Immunol* 5 (7):783-92

- Bowen, M. A., Patel, D. D., et al.** (1995). Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med* 181 (6):2213-20
- Boyington, J. C. and Sun, P. D.** (2002). A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol* 38 (14):1007-21
- Braud, V. M., Allan, D. S., et al.** (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391 (6669):795-799
- Bryceson, Y. T., March, M. E., et al.** (2006). Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 214 (1):73-91
- Caligiuri, M. A., Murray, C., et al.** (1993). Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J Clin Invest* 91 (1):123-32
- Caligiuri, M. A., Zmuidzinas, A., et al.** (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med* 171 (5):1509-26
- Cameron, A. L., Kirby, B., et al.** (2003). Circulating natural killer cells in psoriasis. *Br J Dermatol* 149 (1):160-4
- Campbell, J. J., Qin, S., et al.** (2001). Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* 166 (11):6477-82
- Cayrol, R., Wosik, K., et al.** (2008). Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol* 9 (2):137-45
- Cerwenka, A. and Lanier, L. L.** (2003). NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens* 61 (5):335-343
- Chabaud, M., Durand, J. M., et al.** (1999). Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 42 (5):963-70
- Chalupny, N. J., Sutherland, C. L., et al.** (2003). ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun* 305 (1):129-35
- Chan, A., Filer, A., et al.** (2008). Mediation of the proinflammatory cytokine response in rheumatoid arthritis and spondylarthritis by interactions between fibroblast-like synoviocytes and natural killer cells. *Arthritis Rheum* 58 (3):707-17
- Chan, A., Hong, D. L., et al.** (2007). CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* 179 (1):89-94
- Ciccone, E., Pende, D., et al.** (1992). Involvement of HLA class I alleles in natural killer (NK) cell-specific functions: expression of HLA-Cw3 confers selective protection from lysis by alloreactive NK clones displaying a defined specificity (specificity 2). *J Exp Med* 176 (4):963-71
- Colonna, M., Moretta, A., et al.** (2000). A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function. *Immunol Today* 21 (9):428-31

- Colonna, M., Navarro, F., et al.** (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 186 (11):1809-18
- Colucci, F., Caligiuri, M. A., et al.** (2003). What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 3 (5):413-25
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., et al.** (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22 (11):633-640
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., et al.** (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97 (10):3146-3151
- Cosman, D., Mullberg, J., et al.** (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14 (2):123-33
- Dalbeth, N. and Callan, M. F.** (2002). A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints. *Arthritis Rheum* 46 (7):1763-72
- Dalbeth, N., Gundle, R., et al.** (2004). CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol* 173 (10):6418-26
- de Matos, C. T., Berg, L., et al.** (2007). Activating and inhibitory receptors on synovial fluid natural killer cells of arthritis patients: role of CD94/NKG2A in control of cytokine secretion. *Immunology* 122 (2):291-301
- Falk, C. S., Mach, M., et al.** (2002). NK cell activity during human cytomegalovirus infection is dominated by US2-11-mediated HLA class I down-regulation. *J Immunol* 169 (6):3257-66
- Fanger, N. A., Cosman, D., et al.** (1998). The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur J Immunol* 28 (11):3423-34
- Fearon, D. T. and Locksley, R. M.** (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272 (5258):50-3
- Fehniger, T. A., Cooper, M. A., et al.** (2002). CD56bright Natural Killer Cells are Present in Human Lymph Nodes and are Activated by T cell Derived IL-2: a Potential New Link between Adaptive and Innate Immunity. *Blood*
- Ferlazzo, G., Thomas, D., et al.** (2004). The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 172 (3):1455-62
- Fort, M. M., Leach, M. W., et al.** (1998). A role for NK cells as regulators of CD4+ T cells in a transfer model of colitis. *J Immunol* 161 (7):3256-61
- Franklin, E. C., Holman, H. R., et al.** (1957). An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 105 (5):425-38
- French, A. R. and Yokoyama, W. M.** (2004). Natural killer cells and autoimmunity. *Arthritis Res Ther* 6 (1):8-14
- Freud, A. G., Becknell, B., et al.** (2005). A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* 22 (3):295-304

- Fritsch, R., Eselbock, D., et al.** (2002). Characterization of autoreactive T cells to the autoantigens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 (RA33) and filaggrin in patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol* 169 (2):1068-76
- Gangemi, R. M., Swack, J. A., et al.** (1989). Anti-T12, an anti-CD6 monoclonal antibody, can activate human T lymphocytes. *J Immunol* 143 (8):2439-47
- Gaston, J. S.** (2008). Cytokines in arthritis--the 'big numbers' move centre stage. *Rheumatology (Oxford)* 47 (1):8-12
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., et al.** (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195 (3):327-33
- Gimferrer, I., Calvo, M., et al.** (2004). Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation. *J Immunol* 173 (4):2262-70
- Gimferrer, I., Ibanez, A., et al.** (2005). The lymphocyte receptor CD6 interacts with syntenin-1, a scaffolding protein containing PDZ domains. *J Immunol* 175 (3):1406-14
- Goldring, S. R.** (2003). Inflammatory mediators as essential elements in bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 73 (2):97-100
- Gregoire, C., Chasson, L., et al.** (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 220 (1):169-82
- Groh, V., Bruhl, A., et al.** (2003). Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (16):9452-7
- Groh, V., Rhinehart, R., et al.** (2001). Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2 (3):255-60
- Grom, A. A., Villanueva, J., et al.** (2003). Natural killer cell dysfunction in patients with systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis and macrophage activation syndrome. *J Pediatr* 142 (3):292-6
- Haringman, J. J. and Tak, P. P.** (2004). Chemokine blockade: a new era in the treatment of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther* 6 (3):93-7
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., et al.** (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6 (11):1123-32
- Herold, K. C., Huen, A., et al.** (1984). Alterations in lymphocyte subpopulations in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: exploration of possible mechanisms and relationships to autoimmune phenomena. *Diabetologia* 27 Suppl 102-5
- Ho, E. L., Carayannopoulos, L. N., et al.** (2002). Costimulation of multiple NK cell activation receptors by NKG2D. *J Immunol* 169 (7):3667-75
- Hoffman, T.** (1980). Natural killer function in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 23 (1):30-5
- Hofmeister, V. and Weiss, E. H.** (2003). HLA-G modulates immune responses by diverse receptor interactions. *Semin Cancer Biol* 13 (5):317-23

- Jacob, C. O., Holoshitz, J., et al.** (1989). Heterogeneous effects of IFN-gamma in adjuvant arthritis. *J Immunol* 142 (5):1500-5
- Joo, Y. S., Singer, N. G., et al.** (2000). Evidence for the expression of a second CD6 ligand by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 43 (2):329-35
- Karlhofer, F. M., Ribaud, R. K., et al.** (1992). MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 358 (6381):66-70
- Kärre, K.** (1981). On the Immunobiology of Natural Killer Cells. Doctoral thesis (Karolinska Institute):Stockholm
- Kastrukoff, L. F., Morgan, N. G., et al.** (1998). A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 86 (2):123-33
- Kiessling, R., Klein, E., et al.** (1975). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 5 (2):112-7
- Kimata, H., Shanahan, F., et al.** (1987). Modulation of ongoing human immunoglobulin synthesis by natural killer cells. *Cell Immunol* 107 (1):74-88
- Koch, A. E.** (2005). Chemokines and their receptors in rheumatoid arthritis: future targets? *Arthritis Rheum* 52 (3):710-21
- Koopman, L. A., Kopcow, H. D., et al.** (2003). Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 198 (8):1201-12
- Kotake, S., Udagawa, N., et al.** (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 103 (9):1345-52
- Langrish, C. L., Chen, Y., et al.** (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201 (2):233-40
- Lanier, L. L.** (1998). NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16 359-93
- Lanier, L. L.** (2003). Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 15 (3):308-314
- Lanier, L. L.** (2005). NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23 225-74
- Lanier, L. L., Le, A. M., et al.** (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136 (12):4480-6
- Lazetic, S., Chang, C., et al.** (1996). Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 157 (11):4741-5
- Lee, N., Llano, M., et al.** (1998). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (9):5199-5204
- Leibson, P. J.** (1997). Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* 6 (6):655-61
- Levesque, M. C., Heinly, C. S., et al.** (1998). Cytokine-regulated expression of activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166) on monocyte-lineage cells and in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 41 (12):2221-9

- Liao, Y. H., Jee, S. H., et al.** (2006). Increased expression of the natural killer cell inhibitory receptor CD94/NKG2A and CD158b on circulating and lesional T cells in patients with chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 155 (2):318-24
- Liu, R., Van Kaer, L., et al.** (2006). Autoreactive T cells mediate NK cell degeneration in autoimmune disease. *J Immunol* 176 (9):5247-54
- Ljunggren, H. G. and Karre, K.** (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 11 (7):237-244
- Long, E. O.** (1999). Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 17 875-904
- Long, E. O. and Rajagopalan, S.** (2000). HLA class I recognition by killer cell Ig-like receptors. *Semin. Immunol.* 12 (2):101-108
- Lopez-Botet, M., Llano, M., et al.** (2000). NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Semin. Immunol.* 12 (2):109-119
- Lopez-Botet, M., Navarro, F., et al.** (1999). How do NK cells sense the expression of HLA-G class Ib molecules? *Semin. Cancer Biol.* 9 (1):19-26
- Lorini, R., Moretta, A., et al.** (1994). Cytotoxic activity in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 23 (1):37-42
- Loza, M. J. and Perussia, B.** (2004). The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions. *J Immunol* 172 (1):88-96
- Lubberts, E., Koenders, M. I., et al.** (2005). The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 7 (1):29-37
- Luszczek, W., Manczak, M., et al.** (2004). Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol* 65 (7):758-66
- Mailliard, R. B., Alber, S. M., et al.** (2005). IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J Exp Med* 202 (7):941-53
- Majorczyk, E., Pawlik, A., et al.** (2007). Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with complications of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 8 (8):678-83
- Mallon, E., Bunce, M., et al.** (1997). HLA-CW\*0602 is a susceptibility factor in type I psoriasis, and evidence Ala-73 is increased in male type I psoriatics. *J Invest Dermatol* 109 (2):183-6
- Mandelboim, O., Lieberman, N., et al.** (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409 (6823):1055-60
- Martin, A. M., Kulski, J. K., et al.** (2002). Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. *Trends Immunol.* 23 (2):81-88
- Martin, M. P., Nelson, G., et al.** (2002). Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J. Immunol.* 169 (6):2818-2822
- Mayer, B., Funke, I., et al.** (1990). Expression of the CD6 T lymphocyte differentiation antigen in normal human brain. *J Neuroimmunol* 29 (1-3):193-202

- McClain, M. T., Heinlen, L. D., et al.** (2005). Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat Med* 11 (1):85-9
- McInnes, I. B. and Schett, G.** (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7 (6):429-42
- Meyer, L. H., Franssen, L., et al.** (2006). The role of mesenchymal cells in the pathophysiology of inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20 (5):969-81
- Middleton, D., Meenagh, A., et al.** (2007). No association in frequency of KIR receptors in patients with rheumatoid arthritis from Northern Ireland. *Tissue Antigens* 69 (6):577-82
- Miossec, P.** (2003). Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis Rheum* 48 (3):594-601
- Moretta, A., Biassoni, R., et al.** (2000). Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 21 (5):228-34
- Moretta, A., Bottino, C., et al.** (1990). Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 172 (6):1589-98
- Moretta, A., Bottino, C., et al.** (1996). Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 14 619-48
- Moretta, A., Sivori, S., et al.** (1995). Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 182 (3):875-884
- Moretta, L., Biassoni, R., et al.** (2000). Human NK-cell receptors. *Immunol. Today* 21 (9):420-422
- Moretta, L., Bottino, C., et al.** (2001). Human natural killer cell function and receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1 (4):387-391
- Moretta, L., Mingari, M. C., et al.** (1996). The molecular basis of natural killer (NK) cell recognition and function. *J. Clin. Immunol.* 16 (5):243-253
- Morimoto, C., Rudd, C. E., et al.** (1988). 2H1--a novel antigen involved in T lymphocyte triggering. *J Immunol* 140 (7):2165-70
- Munschauer, F. E., Hartrich, L. A., et al.** (1995). Circulating natural killer cells but not cytotoxic T lymphocytes are reduced in patients with active relapsing multiple sclerosis and little clinical disability as compared to controls. *J Neuroimmunol* 62 (2):177-81
- Nagler, A., Lanier, L. L., et al.** (1989). Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 143 (10):3183-91
- Nagler, A., Lanier, L. L., et al.** (1990). Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. *J Exp Med* 171 (5):1527-33
- Nakae, S., Iwakura, Y., et al.** (2007). Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J Leukoc Biol* 81 (5):1258-68
- Natali, P. G., Nicotra, M. R., et al.** (1989). Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (17):6719-23

- Natarajan, K., Dimasi, N., et al.** (2002). Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu Rev Immunol* 20 853-85
- Negishi, K., Waldeck, N., et al.** (1986). Natural killer cell and islet killer cell activities in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29 (6):352-7
- Nelson, G. W., Martin, M. P., et al.** (2004). Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol* 173 (7):4273-6
- Nepom, G. T., Byers, P., et al.** (1989). HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 32 (1):15-21
- Nickoloff, B. J., Bonish, B., et al.** (2000). Characterization of a T cell line bearing natural killer receptors and capable of creating psoriasis in a SCID mouse model system. *J. Dermatol. Sci.* 24 (3):212-225
- Nitta, T., Yagita, H., et al.** (1989). Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J Exp Med* 170 (5):1757-61
- Osorio, L. M., Garcia, C. A., et al.** (1994). The anti-CD6 mAb, IOR-T1, defined a new epitope on the human CD6 molecule that induces greater responsiveness in T cell receptor/CD3-mediated T cell proliferation. *Cell Immunol* 154 (1):123-33
- Ottaviani, C., Nasorri, F., et al.** (2006). CD56brightCD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *Eur J Immunol* 36 (1):118-28
- Paleolog, E. M.** (2002). Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4 Suppl 3 S81-90
- Pantel, K., Schlimok, G., et al.** (1991). Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res* 51 (17):4712-5
- Park, H., Li, Z., et al.** (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6 (11):1133-41
- Patel, D. D., Wee, S. F., et al.** (1995). Identification and characterization of a 100-kD ligand for CD6 on human thymic epithelial cells. *J Exp Med* 181 (4):1563-8
- Penack, O., Gentilini, C., et al.** (2005). CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia* 19 (5):835-40
- Peritt, D., Robertson, S., et al.** (1998). Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol* 161 (11):5821-4
- Piccioli, D., Sbrana, S., et al.** (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195 (3):335-41
- Pridgeon, C., Lennon, G. P., et al.** (2003). Natural killer cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients exhibit a CD56bright,CD94bright,CD158negative phenotype. *Rheumatology (Oxford)* 42 (7):870-8
- Prinz, J. C., Vollmer, S., et al.** (1999). Selection of conserved TCR VDJ rearrangements in chronic psoriatic plaques indicates a common antigen in psoriasis vulgaris. *Eur. J. Immunol.* 29 (10):3360-3368



- Pulendran, B. and Ahmed, R.** (2006).Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development.*Cell* 124 (4):849-63
- Raulet, D. H.** (2003).Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands.*Nat.Rev.Immunol.* 3 (10):781-790
- Raulet, D. H. and Vance, R. E.** (2006).Self-tolerance of natural killer cells.*Nat Rev Immunol* 6 (7):520-31
- Ravetch, J. V. and Lanier, L. L.** (2000).Immune inhibitory receptors.*Science* 290 (5489):84-9
- Robertson, M. J.** (2002).Role of chemokines in the biology of natural killer cells.*J Leukoc Biol* 71 (2):173-83
- Robertson, M. J., Caligiuri, M. A., et al.** (1990).Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytolysis.*J Immunol* 145 (10):3194-201
- Robertson, M. J., Cameron, C., et al.** (1999).Immunological effects of interleukin 12 administered by bolus intravenous injection to patients with cancer.*Clin Cancer Res* 5 (1):9-16
- Robertson, M. J. and Ritz, J.** (1990).Biology and clinical relevance of human natural killer cells.*Blood* 76 (12):2421-38
- Robertson, M. J., Soiffer, R. J., et al.** (1992).Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF.*J Exp Med* 175 (3):779-88
- Robinson, E., Keystone, E. C., et al.** (1995).Chemokine expression in rheumatoid arthritis (RA): evidence of RANTES and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 beta production by synovial T cells.*Clin Exp Immunol* 101 (3):398-407
- Robinson, J., Waller, M. J., et al.** (2003).IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex.*Nucleic Acids Res* 31 (1):311-4
- Romagnani, C., Juelke, K., et al.** (2007).CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation.*J Immunol* 178 (8):4947-55
- Root, L. L. and Shipley, G. D.** (2000).Normal human fibroblasts produce membrane-bound and soluble isoforms of FGFR-1.*Mol Cell Biol Res Commun* 3 (2):87-97
- Saifullah, M. K., Fox, D. A., et al.** (2004).Expression and characterization of a novel CD6 ligand in cells derived from joint and epithelial tissues.*J Immunol* 173 (10):6125-33
- Sato, K.** (2008).Th17 Cells and Rheumatoid Arthritis -From the Standpoint of Osteoclast Differentiation.*Allergol Int* 57 (2):109-114
- Saulquin, X., Gastinel, L. N., et al.** (2003).Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j).*J.Exp.Med.* 197 (7):933-938
- Schellekens, G. A., de Jong, B. A., et al.** (1998).Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies.*J Clin Invest* 101 (1):273-81

- Schleypen, J. S., Baur, N., et al.** (2006). Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12 (3 Pt 1):718-25
- Schulze-Koops, H. and Kalden, J. R.** (2001). The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15 (5):677-91
- Seemayer, C. A., Kuchen, S., et al.** (2003). Cartilage destruction mediated by synovial fibroblasts does not depend on proliferation in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 162 (5):1549-57
- Seliger, B., Cabrera, T., et al.** (2002). HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol* 12 (1):3-13
- Shah, P. D., Gilbertson, S. M., et al.** (1985). Dendritic cells that have interacted with antigen are targets for natural killer cells. *J Exp Med* 162 (2):625-36
- Shi, F. D., Ljunggren, H. G., et al.** (2001). Innate immunity and autoimmunity: from self-protection to self-destruction. *Trends Immunol* 22 (2):97-101
- Shi, F. D., Takeda, K., et al.** (2000). IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of IFN-gamma by NK cells. *J Immunol* 165 (6):3099-104
- Shi, F. D., Wang, H. B., et al.** (2000). Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat Immunol* 1 (3):245-51
- Singer, N. G., Fox, D. A., et al.** (2002). CD6: expression during development, apoptosis and selection of human and mouse thymocytes. *Int Immunol* 14 (6):585-97
- Singer, N. G., Richardson, B. C., et al.** (1996). Role of the CD6 glycoprotein in antigen-specific and autoreactive responses of cloned human T lymphocytes. *Immunology* 88 (4):537-43
- Singh, R., Aggarwal, A., et al.** (2007). Th1/Th17 cytokine profiles in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthritis. *J Rheumatol* 34 (11):2285-90
- Sivori, S., Pende, D., et al.** (1999). NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* 29 (5):1656-1666
- Smolen, J. S. and Steiner, G.** (2001). Rheumatoid arthritis is more than cytokines: autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44 (10):2218-20
- Smolen, J. S. and Steiner, G.** (2003). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2 (6):473-88
- Stewart, C. A., Laugier-Anfossi, F., et al.** (2005). Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (37):13224-9
- Suzuki, N., Suzuki, T., et al.** (1991). Evidence for the involvement of CD56 molecules in alloantigen-specific recognition by human natural killer cells. *J Exp Med* 173 (6):1451-61

- Suzuki, Y., Hamamoto, Y., et al.** (2004). Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* 122 (5):1133-6
- Takemura, S., Braun, A., et al.** (2001). Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 167 (2):1072-80
- Teitelbaum, S. L.** (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289 (5484):1504-8
- Tiilikainen, A., Lassus, A., et al.** (1980). Psoriasis and HLA-Cw6. *Br J Dermatol* 102 (2):179-84
- Tureson, C., O'Fallon, W. M., et al.** (2003). Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. *Ann Rheum Dis* 62 (8):722-7
- Ulbrecht, M., Maier, S., et al.** (2004). Truncated HLA-G isoforms are retained in the endoplasmic reticulum and insufficiently provide HLA-E ligands. *Hum. Immunol.* 65 (3):200-208
- Veale, D. J. and Fearon, U.** (2006). Inhibition of angiogenic pathways in rheumatoid arthritis: potential for therapeutic targeting. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20 (5):941-7
- Vitale, M., Bottino, C., et al.** (1998). Nkp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J. Exp. Med.* 187 (12):2065-2072
- Vivier, E. and Anfossi, N.** (2004). Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nat. Rev. Immunol.* 4 (3):190-198
- Vivier, E., Tomasello, E., et al.** (2002). Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr. Opin. Immunol.* 14 (3):306-311
- Vollmer, S., Menssen, A., et al.** (2001). Dominant lesional T cell receptor rearrangements persist in relapsing psoriasis but are absent from nonlesional skin: evidence for a stable antigen-specific pathogenic T cell response in psoriasis vulgaris. *J. Invest Dermatol.* 117 (5):1296-1301
- von Geldern, M., Simm, B., et al.** (2006). TCR-independent cytokine stimulation induces non-MHC-restricted T cell activity and is negatively regulated by HLA class I. *Eur J Immunol* 36 (9):2347-58
- Voss, S. D., Daley, J., et al.** (1998). Participation of the CD94 receptor complex in costimulation of human natural killer cells. *J Immunol* 160 (4):1618-26
- Wagner, U. G., Kurtin, P. J., et al.** (1998). The role of CD8+ CD40L+ T cells in the formation of germinal centers in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 161 (11):6390-7
- Warrington, K. J., Takemura, S., et al.** (2001). CD4+, CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems. *Arthritis Rheum* 44 (1):13-20
- Weaver, C. T., Hatton, R. D., et al.** (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25 821-52

- Wee, S., Wang, W. C., et al.** (1994). Characterization of a CD6 ligand(s) expressed on human- and murine-derived cell lines and murine lymphoid tissues. *Cell Immunol* 158 (2):353-64
- Wengner, A. M., Hopken, U. E., et al.** (2007). CXCR5- and CCR7-dependent lymphoid neogenesis in a murine model of chronic antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 56 (10):3271-83
- Weyand, C. M. and Goronzy, J. J.** (2003). Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis. *Ann N Y Acad Sci* 987 140-9
- Williams, F., Meenagh, A., et al.** (2005). Activating killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 is associated with psoriatic arthritis. *Hum Immunol* 66 (7):836-41
- Wilson, N. J., Boniface, K., et al.** (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8 (9):950-7
- Winter, C. C., Gumperz, J. E., et al.** (1998). Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 161 (2):571-7
- Wouters, C. H., Ceuppens, J. L., et al.** (2002). Different circulating lymphocyte profiles in patients with different subtypes of juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 20 (2):239-48
- Yabuhara, A., Yang, F. C., et al.** (1996). A killing defect of natural killer cells as an underlying immunologic abnormality in childhood systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 23 (1):171-7
- Yelavarthi, K. K., Fishback, J. L., et al.** (1991). Analysis of HLA-G mRNA in human placental and extraplacental membrane cells by in situ hybridization. *J Immunol* 146 (8):2847-54
- Yen, J. H., Lin, C. H., et al.** (2006). Killer cell immunoglobulin-like receptor gene's repertoire in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 35 (2):124-7
- Yen, J. H., Moore, B. E., et al.** (2001). Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 193 (10):1159-67
- Yokoyama, W. M. and Kim, S.** (2006). Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev* 214 (1):143-54
- Yokoyama, W. M. and Plougastel, B. F.** (2003). Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat. Rev. Immunol.* 3 (4):304-316
- Young, N. T., Canavez, F., et al.** (2001). Conserved organization of the ILT/LIR gene family within the polymorphic human leukocyte receptor complex. *Immunogenetics* 53 (4):270-278
- Zhang, B., Yamamura, T., et al.** (1997). Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 186 (10):1677-87
- Zimmerman, A. W., Joosten, B., et al.** (2006). Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood* 107 (8):3212-20
- Ziolkowska, M., Koc, A., et al.** (2000). High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* 164 (5):2832-8

**Zompi, S., Hamerman, J. A., et al.** (2003). NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases. *Nat. Immunol.* 4 (6):565-572

**Zvaifler, N. J.** (1973). The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Adv Immunol* 16 (0):265-336

## H Danksagung

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Christine Falk. Zunächst möchte ich ihr für die Auswahl des spannenden Projekts danken! Noch viel wichtiger war aber ihr unglaubliches Engagement bei der Betreuung meiner Doktorarbeit. Ihr großer Enthusiasmus für die Wissenschaft übertrug sich auch auf mich, und so machte mir die Arbeit immer sehr viel Spaß! Durch ihre große Hilfe wurden mir schwierige Phasen um einiges erleichtert, wie es zum Beispiel bei dem Umzug nach Heidelberg der Fall war. Die Unterstützung und das Interesse, welches sie ihren Doktoranden in beruflichen, wie auch in privaten Dingen entgegenbringt sind einfach beeindruckend, und in der Welt der Wissenschaft auf keinen Fall selbstverständlich!

Liebe Chris – ich hätte mir keine bessere Betreuerin vorstellen können! Vielen Dank für alles!

Mein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dolores Schendel, an deren Institut ich die ersten 2 Jahre meiner Doktorarbeit verbringen durfte. Des Weiteren danke ich allen Mitgliedern des Instituts für Molekulare Immunologie für die gute Arbeitsatmosphäre! Besonders hervorheben möchte ich hierbei Barbara Mosetter. Durch ihre große Erfahrung hat sie mir alles Wissenswerte im Labor beigebracht, vor allem das Arbeiten in der Zellkultur. Anfangs war ich teilweise von ihrem außerordentlichen Organisationstalent und all den Laborregeln überfordert, aber jetzt weiß ich die Dinge, die ich bei ihr gelernt habe sehr zu schätzen, und sie werden mich immer begleiten! Danke Babs!

Natürlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Arbeitsgruppe bedanken. Dazu gehören Monika Braun, Stefan Maßen und Christian Quack und seit kurzem auch Tina Lerchl und Ludmila Umansky. Es hat wahnsinnig Spaß gemacht mit euch zusammen zu arbeiten! Eine so tolle Arbeitsatmosphäre ist nicht selbstverständlich und ich habe sie jeden Tag aufs Neue zu schätzen gewusst! Und weil wir so „international“ sind, schicke ich auch ein Dankeschön an de Bubbles nach London!

Ein Extra-Dankeschön geht an meinen Freund Till. Ich danke dir sehr für deine Unterstützung und dein Verständnis, das du mir in den Jahren meiner Doktorarbeit entgegengebracht hast. Dein Rückhalt hat mir immer sehr viel Kraft gegeben.

Das größte Dankeschön gilt meiner Schwester und meinen Eltern. Ohne eure finanzielle Hilfe während meiner gesamten Ausbildung wäre mir Vieles so nicht möglich gewesen. Viel wichtiger ist mir jedoch eure geistige Unterstützung, die ihr mir in all den Jahren entgegengebracht habt! Ihr habt mir immer wieder gezeigt, wie sehr ihr an mich glaubt, habt all meine Sorgen und Freuden geteilt und seid einfach immer für mich da gewesen! Vielen Dank für alles – ihr seid die beste Familie die man sich vorstellen kann!

# I Anhang

## 1 ULBP4 DNS- und Proteinsequenzen

**Abb. 50 DNS-Sequenzvergleich: Wildtyp ULBP4 und synthetisches ULBP4**

Das synthetische ULBP4-Gen (blau) besitzt eine „angepasste Codonusage“ und somit unterscheidet sich die DNS-Sequenz durch einige Nukleotide (rot) von der wt-ULBP4-Sequenz (schwarz). Die beiden Proteine besitzen jedoch die gleiche Aminosäuresequenz (siehe Abb. 51).

Wildtyp ULBP4	Synthetisches ULBP4	Nukleotidunterschied
1 ATGCGAAGAATATCCCTGACTTCTAGCCCTGTGCGCCTTCTTTTGTCTTCT	1 ATGCGGAGAATCAGCCTGACTTCTAGCCCTGTGCGCCTGCTGCTGTTTCT	50
51 GCTGTTGCTACTAATAGCCTTGGAGATCATGGTTGGTGGTCACTCTCTTT	51 GCTGCTGCTGCTGATCGCCCTGGAGATCATGGTGGAAGACACAGCCTGT	100
101 GCTTCAACTTCACTATAAAATCATTGTCCAGACCTGGACAGCCCTGGTGT	101 GCTTCAACTTCACTATCAAAAGCCTGTCCAGACCTGGACAGCCCTGGTGT	150
151 GAAGCGCAGGTCTTCTTGAATAAAAATCTTTCTTCAGTACAACAGTGA	151 GAAGCCAGGTGTTCTTGAATAAGAATCTGTTCTGCAGTACAACAGCGA	200
201 CAACAACATGGTCAAACCTCTGGGCCTCCTGGGGAAGAAGTATATGCCA	201 CAACAACATGGTGAAACCTCTGGGCCTGCTGGGGAAGAAAGTGATGCCA	250
251 CCAGCACTTGGGGAGAATTGACCCAAACGCTGGGAGAAGTGGGGCGAGAC	251 CCTCCACTTGGGGAGAACTGACCCAGACCCTGGGAGAAGTGGGGAGAGAC	300
301 CTCAGGATGCTCCTTTGTGACATCAAACCCAGATAAAGACCAGTGATCC	301 CTGAGGATGCTGCTGTGTGACATCAAACCCAGATCAAGACCAGCGATCC	350
351 TTCCACTCTGCAAGTCGAGATGTTTTGTCAACGCGAAGCAGAACGGTGCA	351 TTCCACTCTGCAGGTGAGATGTTTTGTCAACGCGAAGCCGAACGGTGCA	400
401 CTGGTGCATCCTGGCAGTTCGCCACCAATGGAGAGAAATCCCTCCTCTTT	401 CTGGAGCCTCCTGGCAGTTCGCCACCAATGGAGAGAAATCCCTGCTGTTT	450
451 GACGCAATGAACATGACCTGGACAGTAATTAATCATGAAGCCAGTAAGAT	451 GACGCCATGAACATGACCTGGACCGTGATTAATCATGAAGCCAGCAAGAT	500
501 CAAGGAGACATGGAAGAAAGACAGAGGGCTGGAAAAGTATTTTCAGGAAGC	501 CAAGGAGACATGGAAGAAAGACAGAGGGCTGGAAAAGTATTTTCAGGAAGC	550
551 TCTCAAAGGGGAGACTGCGATCACTGGCTCAGGGAATTCTTAGGGCACTGG	551 TGAGCAAGGGGAGACTGCGATCACTGGCTGAGGGAATTCTTAGGGCACTGG	600
601 GAGGCAATGCCAGAACCGACAGTGTACACAGTAAATGCTTCAGATATCCA	601 GAGGCCATGCCAGAACCTACAGTGAGCCAGTGAATGCTAGCGATATCCA	650
651 CTGGTCTTCTTCTAGTCTACCAGATAGATGGATCATCCTGGGGGCATTCA		700



### Protein Sequenzvergleich: Wildtyp ULBP4 und synthetisches ULBP4

## Wildtyp ULBP4      Synthetisches ULBP4

1	MRRISLTSSPVRLLLFLLLLLLIALEIMVGGHSLCFNFTIKSLSRPGQPWC	50
1	MRRISLTSSPVRLLLFLLLLLLIALEIMVGGHSLCFNFTIKSLSRPGQPWC	50
51	EAQVFLNKNLFLQYNSDNNMVKPLGLLGKKVYATSTWGELTQTLGEVGRD	100
51	EAQVFLNKNLFLQYNSDNNMVKPLGLLGKKVYATSTWGELTQTLGEVGRD	100
101	LRMLLCDIKPQIKTSDPSTLQVEMFCQREAEERCTGASWQFATNGEKSLLF	150
101	LRMLLCDIKPQIKTSDPSTLQVEMFCQREAEERCTGASWQFATNGEKSLLF	150
151	DAMNMTWTVINHEASKIKETWKKDRGLEKYFRKLSKGDCHWLREFLGHW	200
151	DAMNMTWTVINHEASKIKETWKKDRGLEKYFRKLSKGDCHWLREFLGHW	200
201	EAMPEPTVSPVNASDIHWSSSSLPDRWIILGAFILLVLMGIVLICVWWQN	250
201	EAMPEPTVSPVNASDIHWSSSSLPDRWIILGAFILLVLMGIVLICVWWQN	250
251	GEWQAGLWPLRTS	263
250	GEWQAGLWPLRTS	263

## 2 Vektorkarten

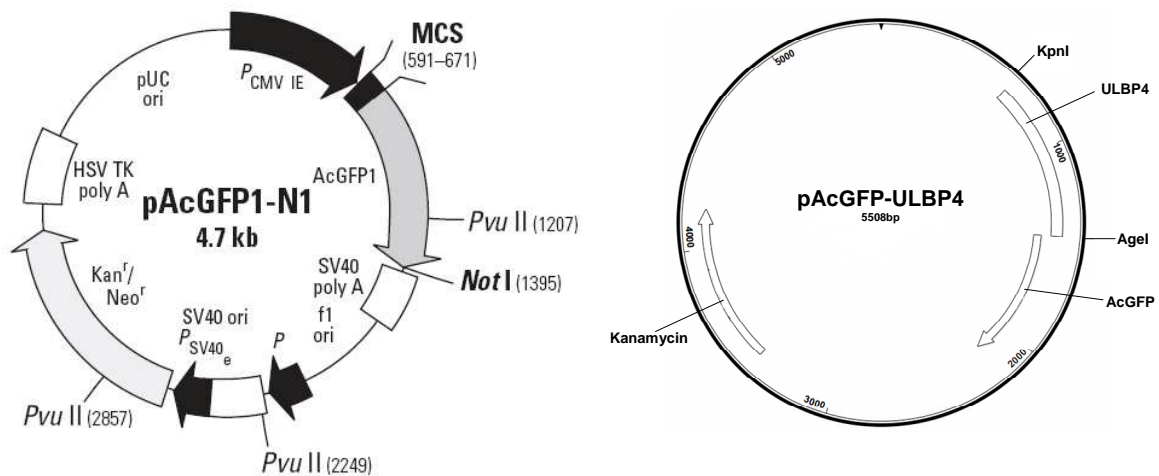


Abb. 52 Vektorkarte pAcGFP1-N1 (Clontech)

Vektorkarte pAcGFP-ULBP4syn

## 3 ULBP4-Expression von C1R-Zellen und Tumorzelllinien

Vor der Transfektion mit pcDNA3.1-ULBP4syn und pAcGFP-ULBP4 Vektoren wurden die C1R-Zellen auf ihre natürliche ULBP4-Expression getestet. Als Kontrolle wurden HaCat, Hela und MelJuso verwendet. Aus den Zellen wurde RNS isoliert, in cDNS umgeschrieben und eine PCR mit ULBP4wt-Primern durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass C1R- und MelJuso-Zellen keine mRNS für ULBP4 enthalten, HaCat und Hela jedoch positiv sind. Dieses Ergebnis konnte in der Analyse der ULBP4-Oberflächenexpression mit eigenem Antikörper bestätigt werden (Abb. 53).

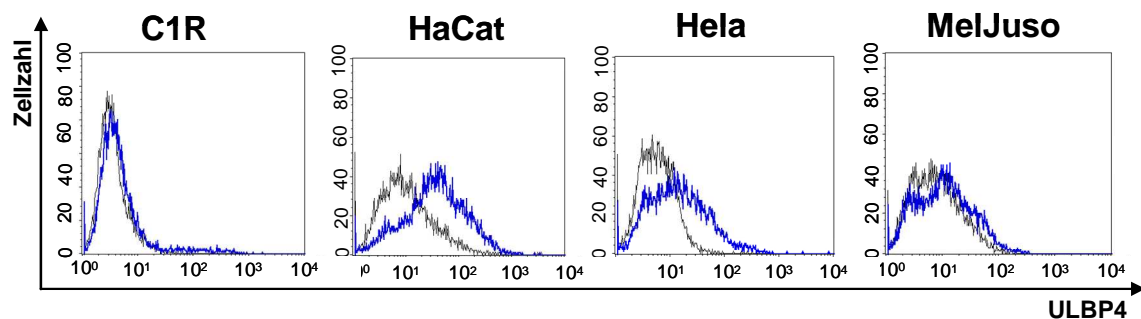
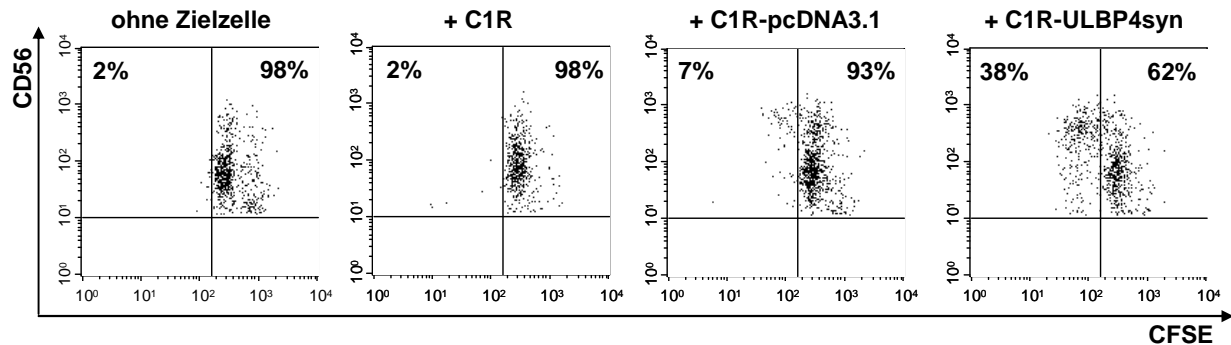


Abb. 53 ULBP4-Expression auf C1R, HaCat, MelJuso und Hela

Die Zelllinien wurden in einer indirekten FACS -Färbung mit dem ULBP4-7H7-Antikörper und einem PE-gekoppelten Sekundäntikörper gefärbt. **Blaue Linie:** ULBP4-Expression, **schwarze Linie:** Isotypkontrolle

## 4 Funktionalität der C1R-ULBP4-Transfektanten

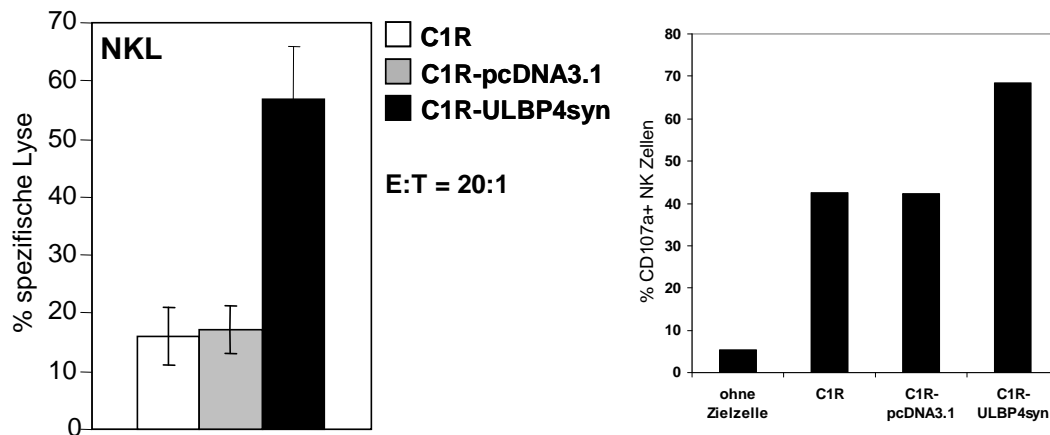
Um zu testen, ob ULBP4 auf den C1R Zellen zu einer Aktivierung der NK-Zellen führen kann, wurde nach einer Stimulation mit C1R, C1R-pcDNA3.1 und C1R-ULBP4-Zellen die Proliferation und die Zytotoxizität peripherer NK-Zellen überprüft. Die C1R-Transfektanten wurden in einem CFSE-Proliferationsversuch eingesetzt. Als Kontrolle wurden PBMC ohne Zielzelle verwendet.



**Abb. 54 Die C1R-ULBP4-Transfektante vermittelt NK-Zell-Proliferation**

Die PBMC eines gesunden Normalspenders wurden CFSE gefärbt und anschließend für 72 Stunden mit den Stimulatorzellen C1R, C1R-pcDNA3.1 und C1R-ULBP4 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und mit CD56 und CD3 Antikörpern gefärbt. Bei der FACS-Auswertung wurde auf die CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK-Zellen gated und die Abnahme der CFSE Intensität mit den Zellteilungen analysiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Stimulatorzelle mitgeführt, um den spontanen Verlust an CFSE darzustellen.

Der Proliferationsversuch (Abb. 54) zeigte, dass ULBP4 als zusätzlicher Ligand für den aktivierenden NK Rezeptor NKG2D bei 38 % der NK-Zellen Proliferation induziert, wobei 7% der NK-Zellen bereits eine Proliferation gegen die Vektorkontrolle C1R-pcDNA3.1 zeigen. Die C1R-Wildtyp-Zellen induzieren keine Proliferation der NK-Zellen, wie der Vergleich mit dem Ansatz ohne Zielzelle zeigt. Um zu untersuchen, ob der zusätzliche NKG2D-Ligand ULBP4 auch die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen erhöhen kann, wurden C1R-ULBP4syn Transfektanten in einem Chromfreisetzungsversuch (CML) und in einem CD107a Degranulationsversuch im Vergleich zu Wildtypzellen und den Vektorkontrollen als Zielzellen eingesetzt.



**Abb. 55 Die C1R-ULBP4-Transfektante vermittelt Zytotoxizität von NK-Zellen**

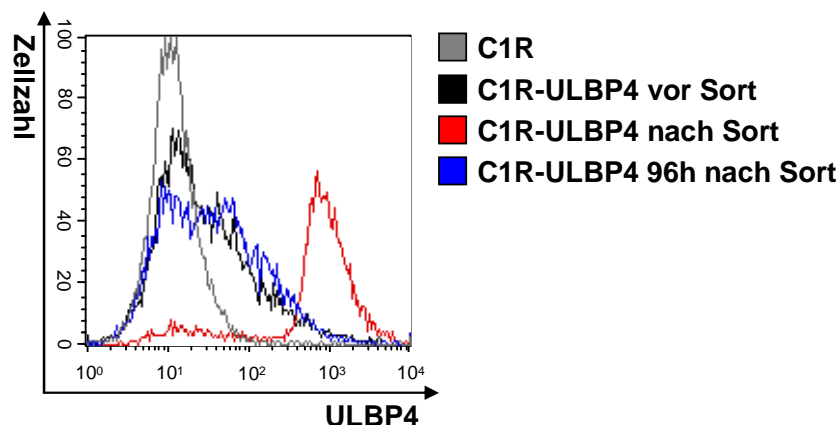
**Links:** Chromfreisetzungsversuch mit NKL-Zellen, welche im Verhältnis 20:1 mit den radioaktiv markierten Zielzellen inkubiert wurden. Gezeigt ist die ULBP4-vermittelte Zunahme der spezifischen Lyse der Zielzellen durch NKL.

**Rechts:** CD107a-Degranulationsversuch mit stimulierten PBMC (48 h, 500 U IL-2/ ml) eines gesunden Normalspenders. Die PBMC wurden im Verhältnis 1:1 mit CD107a Antikörper und den Zielzellen C1R, C1R-pcDNA3.1 und C1R-ULBP4 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit CD56 und CD3 Antikörpern gegengefärbt. Bei der FACS-Auswertung wurde auf die CD56<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> NK-Zellen gegatet und der prozentuale Anteil der CD107a-positiven Zellen an den gesamten NK-Zellen bestimmt. Als Kontrolle der spontanen Degranulation wurde ein Ansatz ohne Stimulatorzellen mitgeführt.

Wie zu erwarten, wurden C1R-Zellen von der NKL-Linie lysiert. Es wurden jedoch nur 16% C1R Zellen spezifisch lysiert, da die C1R-Zellen nicht vollständig HLA-negativ sind und somit keine klassische Zielzelle für NK-Zellen darstellen. Die Lyse der C1R-pcDNA3.1-Zellen ist mit der Lyse der Wildtyp Zellen zu vergleichen. Der zusätzliche Ligand ULBP4 bewirkt jedoch eine 3,5 fache Steigerung der Lyse auf 57%. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass das transfizierte ULBP4 funktionell ist und die Zytotoxizität von NK-Zellen steigern kann. Die Expression von CD107a auf NK-Zellen korreliert nach einer Stimulation mit Zielzellen genau mit der Zytotoxizität, welche in Chromfreisetzungsversuchen gezeigt werden kann (Penack, Gentilini et al. 2005). 43% der peripheren stimulierten NK-Zellen degranulieren gegen die C1R-Wildtypzellen und 42% gegen die Vektorkontrolle C1R-pcDNA3.1. Der prozentuale Anteil der CD107a<sup>+</sup> NK-Zellen kann durch die Stimulation mit ULBP4 um das 1,5 fache auf 68% erhöht werden.

## 5 Natürliche Regulation der ULBP4-Oberflächenexpression

Um möglichst nur hoch ULBP4-exprimierende C1R-Transfektanten zu erhalten, wurden die Zellen sortiert. Hierbei wurden die Zellen mit NKG2D-Tetramer (Labor Prof. Dr. Dirk Busch) gefärbt, da zu diesem Zeitpunkt noch kein monoklonaler ULBP4-Antikörper vorlag. Am Zellsortierer wurden dann die hoch-PE-positiven Zellen isoliert (Joachim Ellwart, HZM). Vor der Sortierung exprimierten nur wenige Zellen schwach ULBP4 (schwarze Kurve) im Vergleich zu den Wildtyp-C1R-Zellen (graue Kurve). Durch die Sortierung wurden nur die hoch ULBP4-exprimierenden Zellen isoliert (rote Kurve) und anschließend wieder in Kultur genommen und expandiert. Nach 96 h wurde die Oberflächenexpression von ULBP4 erneut durch eine FACS-Färbung untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Zellen ULBP4 wieder auf das ursprüngliche Niveau vor der Sortierung herunterreguliert hatten (blaue Kurve). Dies deutet darauf hin, dass die Expression von ULBP4 auf den Zellen einer starken Kontrolle unterliegt.

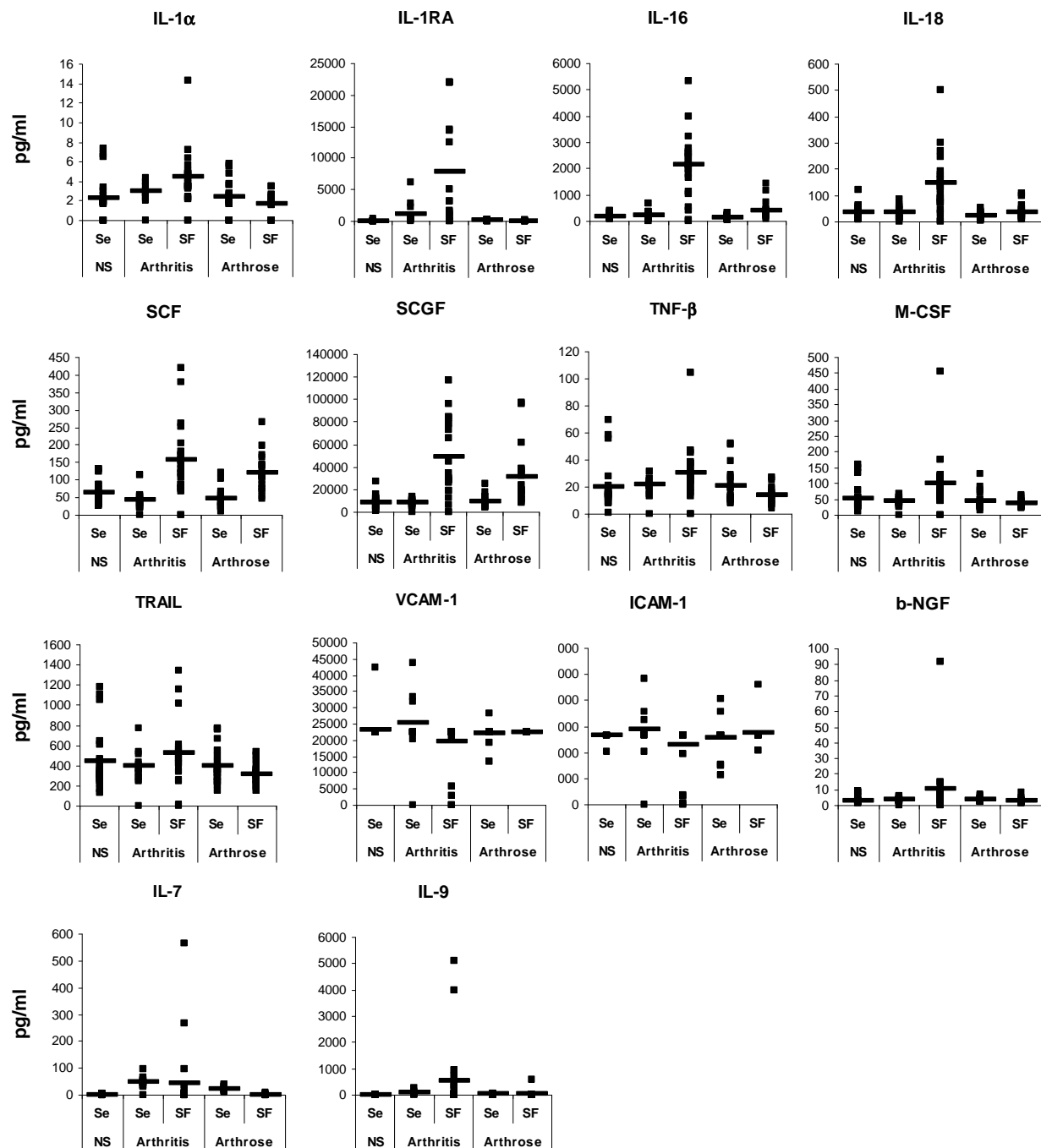


**Abb. 56 Natürliche Regulation der ULBP4-Oberflächenexpression**

Die ULBP4-Expression der C1R-ULBP4-Transfektanten wurde mit NKG2D-Tetrameren und Streptavidin-PE nachgewiesen. Im Vergleich zu den Transfektanten wurden die ULBP4-negativen C1R-Wildtyp-Zellen gefärbt (graue Linie). Für die Zellsortierung wurden die C1R-ULBP4 Transfektanten mit NKG2D-Tetramer gefärbt (schwarze Linie) und die hoch ULBP4-exprimierenden Zellen am Zellsorter isoliert (rote Linie). Nach 96 h Inkubation entsprach die ULBP4-Expression wieder der ursprünglichen Expression der Transfektanten vor der Sortierung (blaue Linie).

**Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das auf den C1R-ULBP4-Zellen exprimierte ULBP4 zu einer Stimulation und Aktivierung von peripheren NK-Zellen und NK-Zelllinien führen kann und somit funktionell ist. Durch eine Erkennung des zusätzlichen NKG2D-Liganden werden die NK-Zellen zur Proliferation, Degranulation und Zytotoxizität angeregt. Interessanterweise aktivieren C1R-Wildtyp-Zellen und C1R-pcDNA3.1 in NK-Zellen deren zytotoxische Aktivität, stellen jedoch keinen Stimulus für die Proliferation der NK-Zellen dar.**

## 6 Weitere Zytokine in Serum und Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten



**Abb. 57 Weitere Zytokine in Serum und Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten im Vergleich zu Normalspendern**

Konzentrationen pg/ml. Normalspender n=23, Arthritis-Patienten Seren (Se) n=13, Arthritis-Patienten Synovialflüssigkeiten (SF) n=23, Arthrose-Patienten Seren (Se) n=18, Arthrose-Patienten Synovialflüssigkeiten (SF) n=19. Die Signifikanzwerte sind in Tab. 15 (S.156) angegeben.

## 7 Signifikanzen der Zytokin-/Chemokineanalyse

		Arthritis		Arthrose				Arthritis		Arthrose				Arthritis		Arthrose	
		Se	SF	Se	SF			Se	SF	Se	SF			Se	SF	Se	SF
MIP-1 $\alpha$	NS Se	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1	IL-17	NS Se	< 0,001	0,02	< 0,001	< 0,001	LIF	NS Se	0,04	< 0,001	0,08	0,9
	AI Se		0,3	< 0,001	< 0,001		AI Se		< 0,001	< 0,001	< 0,001		AI Se		< 0,001	0,9	0,2
	SF			0,01	< 0,001		SF			0,04	< 0,001		SF		< 0,001	< 0,001	< 0,001
AO Se				< 0,001	AO Se				< 0,001	AO Se				< 0,001	< 0,001	0,06	
MIP-1 $\beta$	NS Se	0,5	< 0,001	0,09	0,1	IL-6	NS Se	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	IFN $\alpha$	NS Se	0,8	0,002	0,3	0,1
	AI Se		< 0,001	0,5	0,2		AI Se		< 0,001	< 0,001	0,2		AI Se		< 0,001	0,7	0,2
	SF			< 0,001	< 0,001		SF			< 0,001	< 0,001		SF		< 0,001	< 0,001	< 0,001
AO Se				0,01	AO Se				< 0,001	AO Se				< 0,001	< 0,001	0,5	
MCP-1	NS Se	< 0,001	< 0,001	0,005	< 0,001	IL-12(p40)	NS Se	0,04	0,003	0,1	0,02	IFN $\gamma$	NS Se	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	AI Se		0,09	< 0,001	0,002		AI Se		< 0,001	0,7	0,9		AI Se		0,1	< 0,001	< 0,001
	SF			< 0,001	0,9		SF			< 0,001	< 0,001		SF		0,003	< 0,001	< 0,001
AO Se				< 0,001	AO Se				0,7	AO Se				< 0,001	< 0,001	< 0,001	
IP-10	NS Se	0,06	< 0,001	0,1	< 0,001	IL-12(p70)	NS Se	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,06	TNF $\alpha$	NS Se	< 0,001	< 0,001	0,007	0,02
	AI Se		< 0,001	0,6	< 0,001		AI Se		0,004	< 0,001	< 0,001		AI Se		0,2	0,005	< 0,001
	SF			< 0,001	< 0,001		SF			0,4	< 0,001		SF		< 0,001	< 0,001	< 0,001
AO Se				< 0,001	AO Se				< 0,001	AO Se				< 0,001	< 0,001	< 0,001	
MCP-3	NS Se	< 0,001	< 0,001	0,003	1	IL-1 $\beta$	NS Se	< 0,001	< 0,001	1	0,3	IL-2	NS Se	< 0,001	< 0,001	0,002	0,009
	AI Se		0,3	0,003	< 0,001		AI Se		0,04	< 0,001	< 0,001		AI Se		0,02	< 0,001	< 0,001
	SF			0,001	< 0,001		SF			< 0,001	< 0,001		SF			0,1	< 0,001
AO Se				< 0,001	AO Se				0,3	AO Se				< 0,001	< 0,001	< 0,001	
Eotaxin	NS Se	0,08	0,5	0,001	< 0,001	IL-15	NS Se	< 0,001	< 0,001	0,3	< 0,001	IL-2RA	NS Se	0,7	< 0,001	0,6	0,009
	AI Se		0,09	< 0,001	< 0,001		AI Se		0,04	< 0,001	0,9		AI Se		0,001	0,5	0,01
	SF			0,2	< 0,001		SF			< 0,001	< 0,001		SF			< 0,001	< 0,001
AO Se				< 0,001	AO Se				< 0,001	AO Se				< 0,001	< 0,001	0,1	
IL-8	NS Se	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	IL-3	NS Se					MIF	NS Se	0,2	0,002	0,9	0,04
	AI Se		< 0,001	0,001	0,8		AI Se						AI Se		0,02	0,3	< 0,001
	SF			< 0,001	< 0,001		SF						SF			0,002	< 0,001
AO Se				0,008	AO Se					AO Se					0,06		
GRO $\alpha$	NS Se	0,05	< 0,001	0,4	0,2	GM-CSF	NS Se					G-CSF	NS Se	0,003	< 0,001	0,05	< 0,001
	AI Se		< 0,001	0,1	1		AI Se						AI Se		< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SF			< 0,001	< 0,001		SF						SF		< 0,001	< 0,001	< 0,001
AO Se				0,2	AO Se					AO Se				< 0,001	< 0,001	< 0,001	
MIG	NS Se	0,06	< 0,001	0,8	< 0,001	SDF-1 $\alpha$	NS Se	0,04	0,004	0,7	0,8	GM-CSF	NS Se	< 0,001	< 0,001	0,04	< 0,001
	AI Se		< 0,001	0,09	< 0,001		AI Se		0,02	0,1	0,007		AI Se		0,6	< 0,001	< 0,001
	SF			< 0,001	< 0,001		SF			0,007	< 0,001		SF			< 0,001	< 0,001
AO Se				0,003	AO Se					AO Se				< 0,001	< 0,001	< 0,001	
RANTES	NS Se	0,3	< 0,001	0,2	< 0,001	CTACK	NS Se	0,002	0,5	0,7	0,01		NS Se				
	AI Se		< 0,001	0,9	< 0,001		AI Se		0,002	0,07	0,2		AI Se				
	SF			< 0,001	0,3		SF			0,4	0,002		SF				
AO Se				< 0,001	AO Se					AO Se							

Tab. 14 Signifikanzen (p-Werte) der Multiplexanalyse zu Abb. 29, Abb. 30 und Abb. 31 (Ergebnisse S.87, S.89 und S.91)

Die Signifikanzen wurden mittels des nicht parametrischen Mann-Whitney-U Tests berechnet. p-Werte <0,001 (hellgrau), p-Werte <0,01 (mittelgrau), p-Werte 0,05-0,01 (dunkelgrau), nicht signifikante p-Werte >0,05 (ohne Markierung)

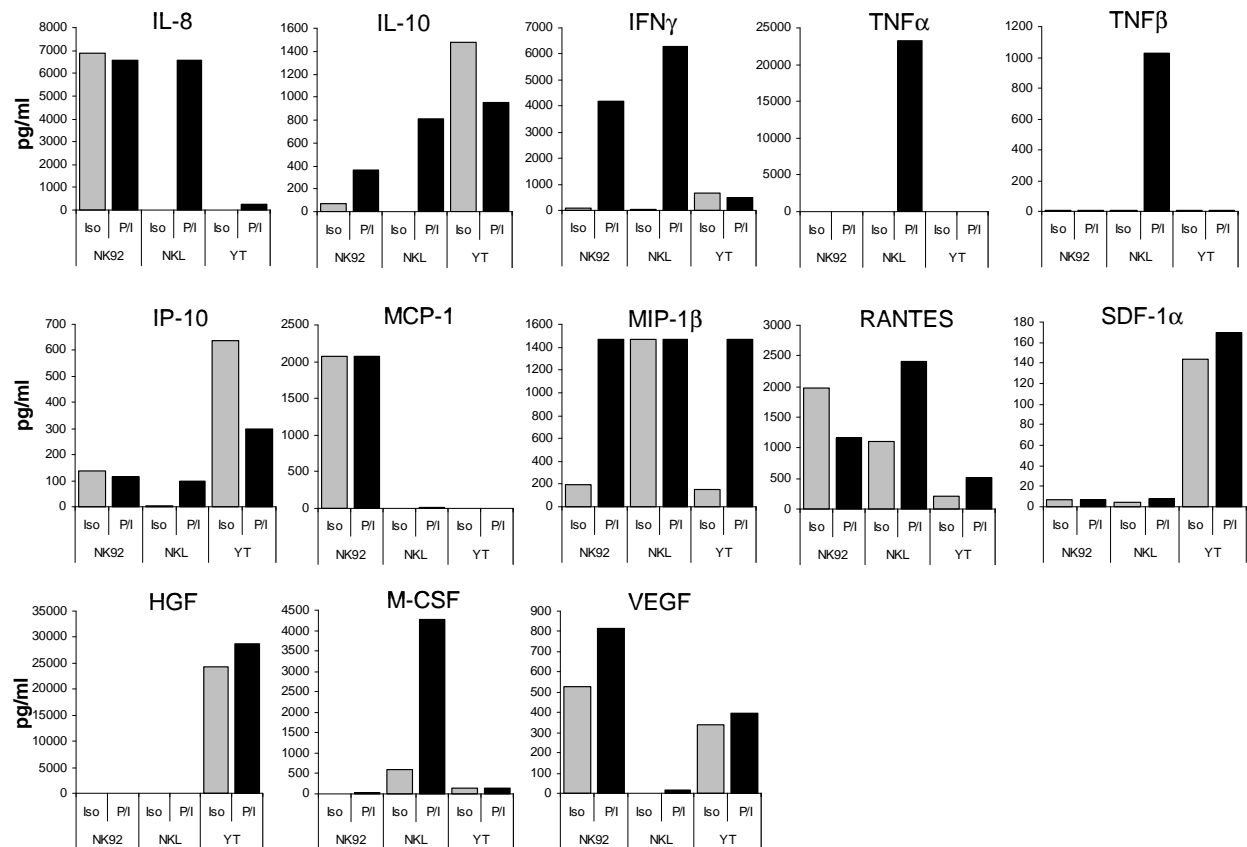
		Arthritis		Arthrose				Arthritis		Arthrose				Arthritis		Arthrose	
		Se	SF	Se	SF			Se	SF	Se	SF			Se	SF	Se	SF
IL-4	NS Se	< 0,001	0,002	< 0,001	< 0,001	HGF	NS Se	0,2	< 0,001	0,6	< 0,001	IL-1 $\alpha$	NS Se	0,003	< 0,001	0,5	0,9
	AI Se		< 0,001	< 0,001	< 0,001		AI Se		< 0,001	1	< 0,001		AI Se		0,02	0,07	< 0,001
	SF						SF			< 0,001	0,03		SF			0,005	< 0,001
	AO Se				< 0,001		AO Se				< 0,001		AO Se				0,2
IL-5	NS Se	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,2	VEGF	NS Se	0,02	< 0,001	0,01	< 0,001	ICAM	NS Se	0,1	0,1	0,8	0,6
	AI Se		0,002	0,004	< 0,001		AI Se		< 0,001	< 0,001	< 0,001		AI Se		0,04	0,3	0,3
	SF				< 0,001		SF			< 0,001	0,3		SF			0,4	0,1
	AO Se				< 0,001		AO Se				< 0,001		AO Se				0,6
IL-10	NS Se	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,3	b-FGF	NS Se	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,9	b-NGF	NS Se	0,03	< 0,001	0,2	0,8
	AI Se		1	0,008	< 0,001		AI Se		< 0,001	< 0,001	< 0,001		AI Se		< 0,001	0,6	0,02
	SF				0,02		SF			0,7	0,002		SF			< 0,001	< 0,001
	AO Se				< 0,001		AO Se				< 0,001		AO Se				0,1
IL-13	NS Se	< 0,001	0,3	< 0,001	0,08	PDGF	NS Se	0,009	< 0,001	< 0,001	< 0,001	SCF	NS Se	0,01	< 0,001	0,03	< 0,001
	AI Se		< 0,001	0,5	< 0,001		AI Se		< 0,001	< 0,001	< 0,001		AI Se		< 0,001	0,7	< 0,001
	SF			< 0,001	0,01		SF			< 0,001	0,04		SF			< 0,001	0,2
	AO Se				< 0,001		AO Se				< 0,001		AO Se				< 0,001
	NS Se						NS Se					SCGF	NS Se	0,7	< 0,001	1	< 0,001
	AI Se						AI Se						AI Se		< 0,001	0,4	< 0,001
	SF						SF						SF			< 0,001	0,1
	AO Se						AO Se						AO Se				< 0,001
	NS Se	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,007		NS Se	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,007	IL-1RA	NS Se	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,007
	AI Se				< 0,001		AI Se			< 0,001	< 0,001		AI Se		0,02	< 0,001	< 0,001
	SF				< 0,001		SF			< 0,001	< 0,001		SF			< 0,001	< 0,001
	AO Se				< 0,001		AO Se				< 0,001		AO Se				< 0,001
	NS Se	0,7	< 0,001	0,04	< 0,001		NS Se					IL-16	NS Se	0,7	< 0,001	0,04	< 0,001
	AI Se		< 0,001	0,04	0,01		AI Se						AI Se		< 0,001	0,04	0,01
	SF			< 0,001	< 0,001		SF						SF			< 0,001	< 0,001
	AO Se				< 0,001		AO Se						AO Se				< 0,001
	NS Se	1	< 0,001	0,04	0,8		NS Se					IL-18	NS Se	1	< 0,001	0,04	0,8
	AI Se		< 0,001	0,1	0,7		AI Se						AI Se		< 0,001	0,1	0,7
	SF			< 0,001	< 0,001		SF						SF			< 0,001	< 0,001
	AO Se				0,02		AO Se						AO Se				0,02
	NS Se	0,5	< 0,001	0,5	0,3		NS Se					M-CSF	NS Se	0,5	< 0,001	0,5	0,3
	AI Se		< 0,001	0,4	0,1		AI Se						AI Se		< 0,001	0,4	0,1
	SF			< 0,001	< 0,001		SF						SF			< 0,001	< 0,001
	AO Se				0,6		AO Se						AO Se				0,6
	NS Se	0,01	0,002	0,8	0,4		NS Se					TNF $\beta$	NS Se	0,01	0,002	0,8	0,4
	AI Se		0,03	0,2	0,004		AI Se						AI Se			0,2	0,004
	SF			0,03	< 0,001		SF						SF			0,03	< 0,001
	AO Se				0,1		AO Se						AO Se				0,1
	NS Se	0,5	0,04	0,8	0,3		NS Se					TRAIL	NS Se	0,5	0,04	0,8	0,3
	AI Se		0,06	0,7	0,06		AI Se						AI Se			0,7	0,06
	SF			0,06	0,001		SF						SF			0,06	0,001
	AO Se				0,2		AO Se						AO Se				0,2
	NS Se	0,4	0,02	0,3	0,4		NS Se					VCAM	NS Se	0,4	0,02	0,3	0,4
	AI Se		0,05	0,2	0,2		AI Se						AI Se			0,2	0,2
	SF			0,3	0,05		SF						SF			0,3	0,05
	AO Se				0,5		AO Se						AO Se				0,5
	NS Se	< 0,001	0,6	< 0,001	0,2		NS Se					IL-7	NS Se	< 0,001	0,6	< 0,001	0,2
	AI Se		< 0,001	< 0,001	< 0,001		AI Se						AI Se		< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SF			< 0,001	0,09		SF						SF			< 0,001	0,09
	AO Se				< 0,001		AO Se						AO Se				< 0,001
	NS Se	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,005		NS Se					IL-9	NS Se	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,005
	AI Se		0,03	< 0,001	< 0,001		AI Se						AI Se			0,9	< 0,001
	SF				< 0,001		SF						SF				< 0,001
	AO Se				< 0,001		AO Se						AO Se				< 0,001

Tab. 15 Signifikanzen (p-Werte) der Multiplexanalyse zu Abb. 32, Abb. 33 und Abb. 57 (Ergebnisse S.92 und S.93, Anhang S.154)

Die Signifikanzen wurden mittels des nicht parametrischen Mann-Whitney-U Tests berechnet. p-Werte <0,001 (hellgrau), p-Werte <0,01 (mittelgrau), p-Werte 0,05-0,01 (dunkelgrau), nicht signifikante p-Werte >0,05 (ohne Markierung)



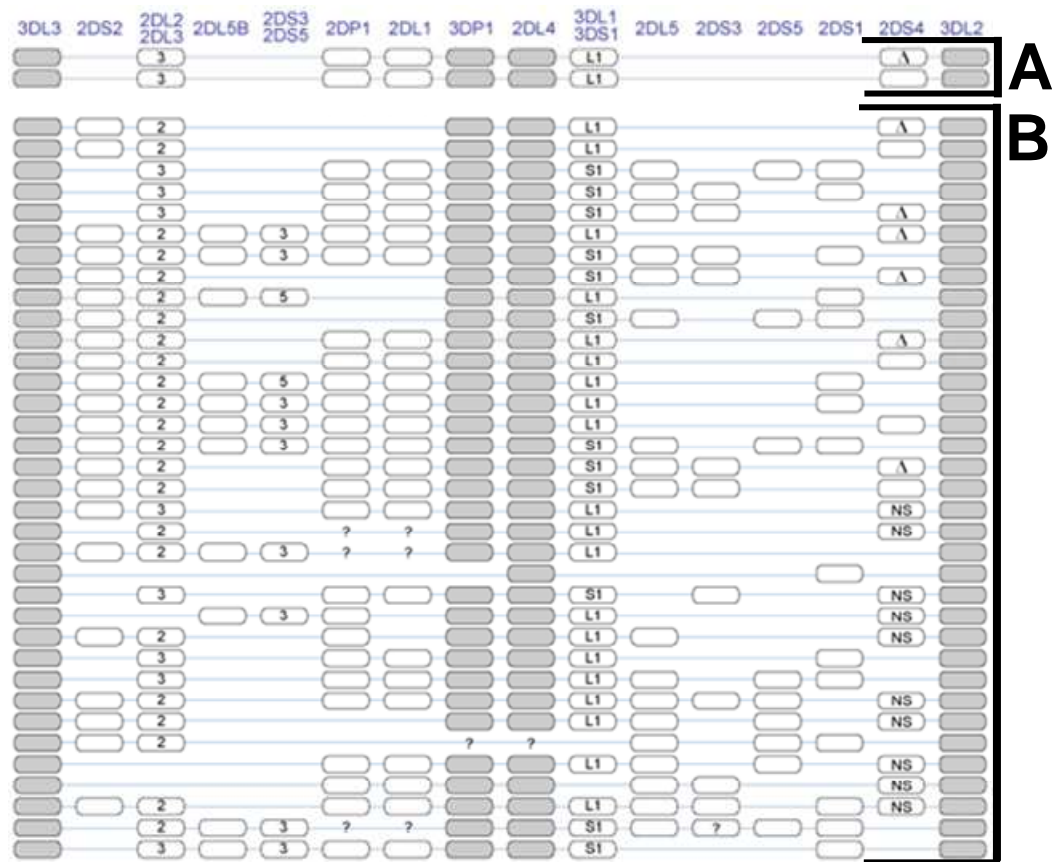
## 8 Zytokinmuster der NK-Zelllinien NKL, NK92 und YT



**Abb. 58** Zytokinmuster der NK-Zelllinien NK92, NKL und YT nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin

Die NK-Zelllinien wurden für 24 Stunden mit PMA/Ionomycin (P/I) stimuliert und die Zytokine mittels der Luminex Multiplex Methode im Überstand gemessen. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Isotyp-Antikörper gekoppelte Beads (Iso) inkubiert. Die Konzentrationen sind in pg/ml angegeben.

## 9 KIR-Genlocus und Haplotypen



**Abb. 59 KIR-Haplotypen**

Die zwei Haplotypgruppen A und B unterscheiden sich durch die Anzahl und die Allele der Gene, die sie beinhalten. Die Rahmen-KIR-Gene (3DL3, 3DP1, 2DL4 und 3DL2) sind in jedem Haplotyp vorhanden. Haplotyp A besitzt 6 inhibierende KIR-Gene (2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL1, 3DL2 und 3DL3) und ein aktivierendes KIR-Gen (KIR2DS4), welches im Haplotyp A $\Delta$  ein nicht exprimierbares Nullallel aufweist. Haplotyp B kann sich aus einer Vielzahl aktivierender und inhibierender KIR-Gene in verschiedenen Kombinationen zusammensetzen (nach Carrington et al).

## 10 KIR- und HLA-C-Genotypen der Psoriasis-Patienten

	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DS3	2DS5	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DS1	3DL1	2DL5A	2DS1	2DS4	3DL2	Haplotyp	HLA-Cw*06	HLA-C Gruppen
PSO#30	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	AΔ/B		C2
PSO#31	x		x	x			x	x	x	x		x			x	x	AΔ/AΔ	x	C2
PSO#32	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x			x	A/B	x	C1
PSO#33	x	x	x	x			x	x	x	x		x				x	A/B		C1
PSO#34	x	x	x		x		x	x	x	x		x	x			x	B/B		C1
PSO#35	x	x	x		x		x	x	x	x		x	x			x	B/B		C1
PSO#36	x			x			x	x	x	x		x	x			x	AΔ/AΔ	x	C2
PSO#37	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/AΔ	x	C2
PSO#38	x	x	x	x			x	x	x	x		x				x	A/B	x	C2
PSO#39	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/AΔ		C2
PSO#40	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	AΔ/B		C1
PSO#41	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x			x	A/B	x	C2
PSO#43	x	x	x	x			x	x	x	x		x				x	A/B		C1
PSO#44	x	x	x		x				x	x	x	x	x	x		x	B/B	x	C1
PSO#45	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/AΔ		C1
PSO#47	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/AΔ		C2
PSO#48	x			x			x	x	x	x		x				x	A/A		C1
PSO#49	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/AΔ		C1
PSO#50	x	x	x	x			x	x	x	x		x				x	A/B	x	C2
PSO#53	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x		x	x		x	B/B		C1
PSO#54	x			x			x	x	x	x	x	x		x		x	AΔ/B		C1
PSO#55	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/AΔ		C1
PSO#56	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/A	x	C2
PSO#58	x	x	x				x	x	x	x		x				x	B/B	x	C2
PSO#60	x			x			x	x	x	x		x				x	A/A		C1
PSO#61	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/AΔ	x	C2
PSO#62	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x		x	A/B		C1
PSO#63	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	AΔ/B	x	C2
PSO#64	x	x	x	x			x	x	x	x		x	x			x	AΔ/B		C2
PSO#65	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/A	x	C1
PSO#66	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/AΔ		C1
PSO#67	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/AΔ	x	C2
PSO#68	x		x				x	x	x	x		x				x	A/B	x	C1
PSO#69	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/AΔ	x	C2
PSO#70	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/AΔ		C1
PSO#73	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/A		C1
PSO#75	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	A/B	x	C2
PSO#77	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	A/B		C1
PSO#80	x			x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	A/B		C1
PSO#81	x	x	x		x		x		x	x		x	x			x	B/B		C1
PSO#82	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	A/B		C1

**Tab. 16 Ergebnisse der KIR- und HLA-C-Typisierungen der Psoriasis-Patienten**

Ergebnisse der Multiplex KIR- und HLA-C-Typisierungen der Psoriasis-Patienten (n=41). KIR3DL3, KIR3DP1, KIR2DL4 und KIR3DL2 sind Rahmen-Gene, die bei jedem Haplotyp vorhanden sind. KIR Haplotypen bestehen aus Kombinationen der Halotypen AΔ, A und B. Die Haplotypen unterscheiden sich nach der Anzahl der aktivierenden KIR-Rezeptoren. Haplotyp AΔ/AΔ (hellgelb) besitzt keinen aktivierenden KIR, AΔ/A und A/A besitzen den aktivierenden KIR2DS4 (dunkelgelb), A/B besitzt mehr als einen akt. KIR (orange) und B/B mehr als drei akt. KIR (rot). Des Weiteren ist die Assoziation mit HLA-Cw\*06 gezeigt und die Einteilung in die HLA-C C1- und C2-Gruppen. Die C1-Gruppe (blau) besitzt an Aminosäureposition 80 ein Asparagin (N80) und stellt Liganden für KIR2DL2/3 und KIR2DS2/3 dar. Die C2-Gruppe (grün) besitzt ein Lysin an Position 80 (K80) und stellt Liganden für die KIR2DL1 und KIR2DS1 Moleküle dar.

## 11 KIR- und HLA-C-Genotypen der Arthritis-Patienten

	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DS3	2DS5	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DS1	3DL1	2DL5A	2DS1	2DS4	3DL2	Haplotyp	HLA-Cw*06	HLA-C Gruppen
SYN#01	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	B/B		C2
SYN#02	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x		x	x	A/B		C2
SYN#03	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x			x	x	A/B	x	C1
SYN#04	x	x	x		x		x	x	x	x	x	x	x			x	B/B		C1
SYN#05	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x				x	A/B	x	C2
SYN#06	x	x	x	x	x		x	x	x	x		x	x			x	A/B		C1
SYN#07	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x		x	A/B		C2
SYN#08	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	A/B		C1
SYN#09	x			x		x	x	x	x	x		x	x			x	AΔ/AΔ		C1
SYN#10	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x				x	A/B		C1
SYN#11	x	x	x	x	x		x	x	x	x		x				x	A/B		C1
SYN#12	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x				x	A/B		C1
SYN#13	x			x			x	x	x	x		x				x	A/B		C1
SYN#14	x			x			x	x	x	x	x	x				x	AΔ/AΔ		C1
SYN#15	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	AΔ/B		C1
SYN#16	x	x	x				x	x	x	x	x	x	x	x		x	AΔ/A		C1
SYN#17	x			x	x		x	x	x	x	x	x	x	x		x	A/B		C1
SYN#18	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x			x	A/B	x	C1
SYN#20	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/A	x	C1
SYN#21	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/A		C1
SYN#22	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/AΔ		C1
SYN#23	x			x			x	x	x	x	x	x	x			x	AΔ/B		C1
SYN#24	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x		x	A/B		C1
SYN#25	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	AΔ/B		C1
SYN#26	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/A		C2

**Tab. 17 Ergebnisse der KIR- und HLA-C-Typisierungen der Arthritis-Patienten**

Ergebnisse der Multiplex KIR- und HLA-C-Typisierungen der Arthritis-Patienten (n=25). Die eindeutig diagnostizierten Rheumatoiden Arthritis-Patienten sind in hellgrün markiert. KIR3DL3, KIR3DP1, KIR2DL4 und KIR3DL2 sind Rahmen-Gene, die bei jedem Haplotyp vorhanden sind. KIR Haplotypen bestehen aus Kombinationen der Halotypen AΔ, A und B. Die Haplotypen unterscheiden sich nach der Anzahl der aktivierenden KIR Rezeptoren. Haplotyp AΔ/AΔ (hellgelb) besitzt keinen aktivierenden KIR, AΔ/A und A/A besitzen den aktivierenden KIR2DS4 (dunkelgelb), A/B besitzt mehr als einen akt. KIR (orange) und B/B mehr als drei akt. KIR (rot). Die Assoziation mit HLA-Cw\*06 ist als Vergleich zu den Psoriasis-Patienten gezeigt. Die Einteilung in die HLA-C Gruppen C1 und C2 erfolgt nach der Aminosäure an Position 80. Gruppe C1 (blau) besitzt ein Asparagin (N80) und stellt Liganden für KIR2DL2/3 und KIR2DS2/3 dar. Gruppe C2 (grün) besitzt ein Lysin (K80) und stellt Liganden der KIR2DL1 und KIR2DS1 Moleküle dar.

## 12 KIR- und HLA-C-Genotypen der Normalspender

	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DS3	2DS5	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DS1	3DL1	2DL5A	2DS1	2DS4	3DL2	Haplotyp	HLA-Cw*06	HLA-C Gruppen
HaB	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	A/B		C1
CF	x		x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	AΔ/B		C1
MA	x		x	x			x	x	x	x		x			x	x	AΔ/AΔ		C2
JB	x	x	x	x			x	x	x	x		x			x	x	AΔ/B	x	C2
MH	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	AΔ/B		C2
GA	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/A	x	C1
WG	x			x			x	x	x	x		x				x	AΔ/A		C1
KK	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	A/B		C2
AM	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	B/B	x	C1
TR	x			x			x	x	x	x		x			x	x	AΔ/A	x	C1
FA	x			x			x	x	x	x		x			x	x	AΔ/AΔ		C1
TA	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	AΔ/B		C2
MS	x	x	x	x			x	x	x	x		x			x	x	A/B		C1

**Tab. 18 Ergebnisse der KIR- und HLA-C-Typisierungen der Normalspender**

Ergebnisse der Multiplex KIR- und HLA-C Typisierungen der Normalspender (n=13). KIR3DL3, KIR3DP1, KIR2DL4 und KIR3DL2 sind „Framework“-Gene, die bei jedem Haplotyp vorhanden sind. KIR-Haplotypen bestehen aus Kombinationen der Haplotypen AΔ, A und B. Die Haplotypen unterscheiden sich nach der Anzahl der aktivierenden KIR Rezeptoren. Haplotyp AΔ/AΔ (hellgelb) besitzt keinen aktivierenden KIR, AΔ/A und A/A besitzen den aktivierenden KIR2DS4 (dunkelgelb), A/B besitzt mehr als einen akt. KIR (orange) und B/B mehr als drei akt. KIR (rot). Die Assoziation mit HLA-Cw\*06 ist als Vergleich zu den Psoriasis-Patienten gezeigt. Die Einteilung in die HLA-C Gruppen C1 und C2 erfolgt nach der Aminosäure an Position 80. Gruppe C1 (blau) besitzt ein Asparagin (N80) und stellt Liganden für KIR2DL2/3 und KIR2DS2/3 dar. Gruppe C2 (grün) besitzt ein Lysin (K80) und stellt Liganden der KIR2DL1 und KIR2DS1 Moleküle dar.

## J Lebenslauf

**Name** Barbara Simm  
**Geburtsdatum** 16.05.1979  
**Geburtsort** Kaufbeuren  
**Familienstand** ledig  
**Email** barbara.simm@gmx.de

### Ausbildung

09/1989 - 06/1998      Josef-Effner-Gymnasium, Dachau  
Leistungskurse: Französisch und Biologie  
Abiturnote: 2,6

11/1998 - 04/2004      Studium Diplom Biologie, Technische Universität München  
Abschlussnote: 1,4  
Hauptfach: Mikrobiologie  
Nebenfächer: Genetik, Medizinische Virologie  
Diplomarbeit: „Studien zum Aufbau des Signalkomplexes des latenten Membranproteins (LMP1) von Epstein-Barr Virus mit Hilfe von aufgereinigten Proteinen“  
Durchgeführt am Helmholtz Zentrum München, Abt. Genvektoren

02/2005 - heute      Promotion  
Helmholtz Zentrum München, Prof. Dr. Schendel  
Institut für Molekulare Immunologie (02/2005 – 03/2007),  
und NCT Heidelberg, AG Immunmonitoring (04/2007- heute)  
Betreuerin: PD Dr. C.S. Falk  
Thema: „Die Rolle Natürlicher Killerzellen in der Autoimmunität am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis“

<b>Posterpräsentationen</b>	<p>“Spring School on Immunology” der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Ettal, 2006</p> <p>Summer School “Molecular Interactions during Infection”, Quedlinburg, 2006</p> <p>Hengstenberger Symposium “Natural Killer Cells”, Heidelberg, 2006</p> <p>10<sup>th</sup> Meeting of the Society for Natural Immunity, Cambridge, 2007</p> <p>Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Heidelberg, 2007</p> <p>Luminex “Planet xMAP Europe Seminar”, Amsterdam, 2007</p>
<b>Praktikum</b>	<p><i>Nature</i> Redaktion, München (09/2004-11/2004)</p>
<b>Lehrgänge</b>	<p>Rhetorik Vortragscoaching</p> <p>Statistik Fortbildung in S-Plus</p>
<b>Sprachen</b>	<p>Englisch (fließend), Französisch (sehr gute Kenntnisse), Schwedisch (Grundkenntnisse)</p>
<b>Publikationen</b>	<p>von Geldern M, <b>Simm B</b>, Braun M, Weiss EH, Schendel DJ, Falk CS. <i>TCR-independent cytokine stimulation induces non- MHC-restricted T cell activity and is negatively regulated by HLA class I</i>. Eur J Immunol. 2006 Sep;36(9):2347-58</p> <p><b>Simm B</b>, Braun M, Witt M, Gruber R, Marintschev I, Schendel DJ, Marticke J, Hofmann GO, Falk CS. <i>The Th17 response dominates the hierarchy of the synovial cytokine/chemokine patterns that discriminate autoimmune rheumatic arthritis from non-autoimmune osteoarthritis and correlates with the selective infiltration of CD56<sup>bright</sup> CD6<sup>-</sup> synovial NK cells</i>. Manuskript in Vorbereitung.</p>





# Erklärung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir  
selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, 01.07.2008

---